



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Preparo e caracterização reológica de amostras de colágeno parcialmente desnaturadas

Autor: Élen Klein

Orientador: Nilo Sergio Medeiros Cardozo

Porto Alegre, junho de 2016

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	CONCEITOS FUNDAMENTAIS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	COLÁGENO	2
2.2	APLICAÇÕES DO COLÁGENO.....	4
2.3	DESNATURAÇÃO DO COLÁGENO	5
2.4	ENSAIOS REOLÓGICOS OSCILATÓRIOS EM REGIME LINEAR.....	8
2.5	CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DE COLÁGENOS.....	9
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1	MATERIAIS.....	12
3.2	ANÁLISES REOLÓGICAS.....	12
3.2.1	Desenvolvimento da metodologia de preparação das amostras	12
3.2.2	Condições de teste.....	14
3.3	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	14
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
3.5	PERCENTUAL DE EVAPORAÇÃO DE ÁGUA DURANTE AQUECIMENTO.....	14
4	RESULTADOS.....	15
4.1	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES DE TESTE.....	15
4.2	DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS ENSAIOS REOLÓGICOS	17
4.3	ANÁLISES REOLÓGICAS: REPETITIVIDADE E DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS PARA AVALIAR A CONFIABILIDADE DE RESULTADOS	18
4.4	ANÁLISES REOLÓGICAS: EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO E DO TIPO DE COLÁGENO	20
4.4.1	Comparação entre concentrações para os mesmos colágenos	20
4.4.2	Diferenças entre as amostras de colágeno	25
5	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	28
6	REFERÊNCIAS.....	30
	APÊNDICE A	32
	APÊNDICE B	35
	APÊNDICE C	39
	APÊNDICE D	43
	APÊNDICE E.....	45

RESUMO

Diante do uso promissor de amostras de colágeno como biopolímero e da necessidade de elucidação do comportamento reológico das mesmas frente a diferentes condições de processamento, este trabalho apresenta a caracterização reológica de colágenos desnaturados por água quente (AQ), micro-ondas (MO) e extrusão (EX) nas concentrações de 60, 70 e 80% de água. Por ainda não haver técnicas de processamento destes colágenos e especificamente nestas concentrações para as análises reológicas, também é apresentado neste trabalho o desenvolvimento de um protocolo de processamento dos mesmos nas concentrações indicadas anteriormente. Através da mistura dos colágenos com água nas concentrações de 60, 70 e 80% de água e do aquecimento em forno, obtiveram-se misturas homogêneas, que no caso das concentrações de 70 e 80% podem ser analisadas diretamente em reômetro. Para a concentração de 60% é necessária mais uma etapa de moldagem da amostra em forma de disco, para que a análise reológica possa ser efetuada. Com este processamento, pode-se observar que os colágenos obtidos com diferentes métodos de desnaturação apresentaram padrões de comportamento praticamente iguais para todas as concentrações dentro da faixa de comportamento linear das amostras, diferindo apenas nos valores dos parâmetros reológicos obtidos, o que pode indicar diferenças nas estruturas das mesmas. Cabe ressaltar que os valores dos parâmetros reológicos apresentados pela amostra desnaturada por extrusão, foram bastante diferentes daqueles obtidos com as amostras desnaturadas por água quente e micro-ondas, indicando uma diferença estrutural mais acentuada entre o colágeno EX e os demais. Os dados obtidos na caracterização dos colágenos por calorimetria diferencial de varredura dão suporte aos resultados obtidos nas análises reológicas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Formação da estrutura do colágeno.	2
Figura 4.1 - Misturas obtidas com colágeno obtido por desnaturação em água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C) na concentração de 60% de água em massa.	16
Figura 4.2 - Módulos de perda em cisalhamento para todas as repetições realizadas para os colágenos com 60% de água, desnaturados por água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C) à 25°C.	18
Figura 4.3 - Respostas reológicas para as diferentes concentrações testadas para amostras desnaturadas por: água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C).	21
Figura 4.4 – Resultados médios das varreduras de frequência consecutivas obtidas para a amostra MO70.	23
Figura 4.5 – Resultados médios das análises reológicas utilizando reômetro Gemini para amostras com teores de água de 80% para colágenos desnaturados por: água quente, micro-ondas e extrusão.	25
Figura 4.6 – Valores médios encontrados nas varreduras de deformação utilizando o reômetro Ares para teores de água de (A) 60%, (B) 70% e (C) 80%.	26
Figura A.1 - Módulos de armazenamento em cisalhamento para colágenos desnaturados por água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C) à 25°C e com 70% de água.	33
Figura A.2 - Módulos de armazenamento em cisalhamento para amostras desnaturadas por água quente (A) e micro-ondas (B) à 25°C, com concentração de 80% de água e obtidos no reômetro Ares	34
Figura B.1 - Varreduras de deformação para o colágeno AQ nos testes com concentração de 60% (A), 70% (B), e 80% (C) realizadas no reômetro Ares e com concentração de 80% realizadas no reômetro Gemini (D).	36
Figura B.2 - Varreduras de deformação para o colágeno MO nos testes com concentração de 60% (A), 70% (B), e 80% (C) realizadas no reômetro Ares e com concentração de 80% realizadas no reômetro Gemini (D).	37
Figura B.3 - Varreduras de deformação para o colágeno EX nos testes com concentração de 60% (A) e 70% (B) realizadas no reômetro Ares e com concentração de 80% realizadas no reômetro Gemini (C).	38
Figura C.1 - Módulos médios de armazenamento e de perda em cisalhamento para a primeira e segundas varreduras de frequência para amostras de colágeno com 60% de água desnaturadas por: água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C).	40
Figura C.2 - Módulos médios de armazenamento e de perda em cisalhamento para a primeira e segundas varreduras de frequência para amostras de colágeno com 70% de água desnaturadas por: água quente (A) e extrusão (B).	41
Figura C.3 - Módulos médios de armazenamento e de perda em cisalhamento para a primeira e segundas varreduras de frequência para amostras de colágeno com 80% de água desnaturadas por: água quente (A) e micro-ondas (B).	42
Figura D.1 – Resultados da varredura de frequência completa realizada no reômetro Gemini para as três amostras de colágeno.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Procedimentos testados no desenvolvimento da metodologia de plastificação das amostras.....	13
Tabela 3.2 – Procedimentos testados para preparação das amostras para análise reológica	13
Tabela 4.1 – Resultados obtidos no desenvolvimento da metodologia de preparação das amostras	15
Tabela 4.2 – Resultados obtidos no teste das estratégias de preparação das amostras para análise reológica	17
Tabela 4.3 – Escolha das repetições utilizadas no cálculo das médias dos resultados obtidos no reômetro Ares	20
Tabela 4.4 - Percentual de água evaporada na etapa de aquecimento das amostras, com concentrações de 60% de água	26
Tabela 4.5 – Resultados das análises de calorimetria diferencial de varredura para as amostras desnaturadas por água quente, micro-ondas e extrusão em taxas de aquecimento de 10 e 5°C/min	27
Tabela E.1 – Resultados estatísticos realizados para amostras com teores de 60% de água, agrupadas por frequência.	46
Tabela E.2 – Resultados estatísticos realizados para amostras com teores de 70% de água, agrupadas por frequência.	46
Tabela E.3 – Resultados estatísticos realizados para amostras com teores de 80% de água, agrupadas por frequência.	46
Tabela E.4 – Resultados estatísticos realizados para o colágeno AQ entre diferentes concentrações, agrupados por frequência.....	46
Tabela E.5– Resultados estatísticos realizados para o colágeno MO entre diferentes concentrações, agrupados por frequência.....	47
Tabela E.6– Resultados estatísticos realizados para o colágeno EX entre diferentes concentrações, agrupados por frequência.....	47

LISTA DE SÍMBOLOS

G' – Módulo de armazenamento em cisalhamento

G'' – Módulo de perda em cisalhamento

ω – Frequência

η^* – Viscosidade complexa

γ – Deformação

γ_0 – Amplitude de deformação

τ – Tensão

τ_0 – Amplitude de tensão

δ – Ângulo de fase

1 INTRODUÇÃO

Colágeno é a proteína estrutural mais abundante em animais, estando presente em ossos, peles, cartilagens e ligamentos. Pela sua abundância, é utilizado em diversos produtos como em couros, gelatinas, envoltórios para alimentos e dispositivos médicos, como peles artificiais ou ministradores de medicamento (FRIESS, W; SCHLAPP, 2001; KLÜVER; MEYER, 2013). Seu uso em cada um destes produtos está relacionado ao processamento utilizado para a desnaturação da proteína, em que temos o couro em um dos extremos, no qual a proteína se encontra intacta e a gelatina no outro extremo, em que a molécula de colágeno encontra-se totalmente degradada (KLÜVER; MEYER, 2013).

O colágeno ainda pode ser utilizado como biopolímero e processado por diferentes técnicas industriais, como extrusão ou injeção por moldagem, para obter diferentes formas do produto final, como filmes ou peças moldadas (KLÜVER; MEYER, 2013). Para o uso como biopolímero, a estrutura do colágeno deve possuir suas ligações inter cruzadas e entrelaçamentos das moléculas diminuído, porém não pode estar completamente degradado, a fim de formar gelatina. Deste modo, Klüver e Meyer (2013) desenvolveram três diferentes técnicas de desnaturação de colágeno proveniente de couro bovino e o chamaram de colágeno termoplástico. O nome foi assim dado, pois as moléculas de colágeno se encontram parcialmente desnaturadas, porém o material sob determinadas condições pode ser transformado em um material termoplástico. As técnicas por eles empregadas para desnaturação do colágeno foram uso de banhos de água quente, micro-ondas e extrusão. Em seus estudos, Klüver e Meyer (2013) verificaram que há diferenças nos valores de viscosidade elongacional para as amostras obtidas pelos diferentes métodos de desnaturação utilizados, o que pode indicar diferenças nos graus de quebra das moléculas de colágeno.

O objetivo do presente trabalho é estender o estudo de Klüver e Meyer (2013) por meio da caracterização reológica dos colágenos utilizados por estes autores, através de testes em regime dinâmico, os quais têm potencial para serem mais facilmente correlacionados com variações estruturais. Além disso, como não se tem registro prévio na literatura da aplicação deste tipo de análise para amostras de colágeno nas concentrações utilizadas por Klüver e Meyer (2013), estabeleceu-se também como objetivo do trabalho o desenvolvimento da metodologia de preparação das amostras para as medidas reológicas.

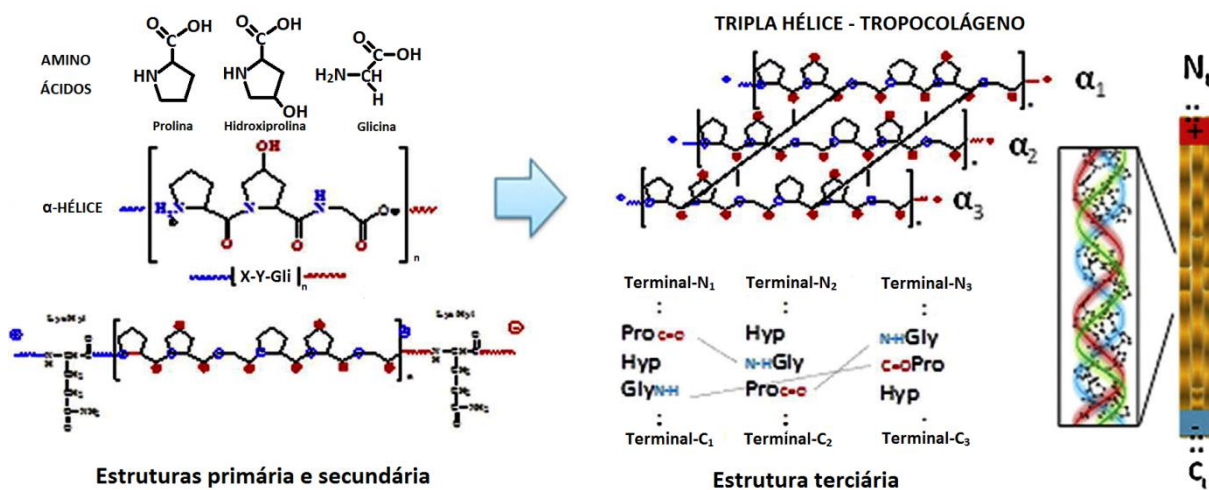
2 CONCEITOS FUNDAMENTAIS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COLÁGENO

Colágeno é o nome dado a proteínas formadas por três cadeias peptídicas entrelaçadas entre si em forma de tripla hélice e ligadas por ligações de hidrogênio. Estes polipeptídeos têm suas cadeias formadas por sequências repetitivas da forma (Gli-X-Y)_n, onde Gli é a glicina e X e Y podem ser quaisquer aminoácidos, porém prolina e hidroxiprolina são os encontrados em maior proporção na maioria dos colágenos (GELSE, K; PÖLSH, E; AIGNER, 2003; GORDON; HAHN, 2010; KADLER et al., 2007; SHOULDERS; RAINES, 2009). Na estrutura da tripla hélice, as três cadeias podem ser do mesmo tipo (homotrímero) ou de dois ou três tipos diferentes (heterotrímeros) (GELSE, K; PÖLSH, E; AIGNER, 2003).

A Figura 2.1 mostra um esquema da formação da estrutura do colágeno, partindo dos aminoácidos (estruturas primárias), que formam a cadeia de polipeptídeo (estrutura secundária), que se ligam por ligações de hidrogênio produzindo a tripla hélice de colágeno, estrutura que recebe o nome de tropocolágeno (estrutura terciária) (ZUBER et al., 2015).

Figura 2.1 - Formação da estrutura do colágeno.



Adaptado de: ZUBER et al., 2015

Os diferentes tipos de colágeno são formados na matriz extracelular e são utilizados pelas células para obter integridade estrutural e outras diversas funções. Até os dias de hoje foram descobertos 28 tipos de colágeno e sua nomenclatura utiliza números romanos existindo, portanto, colágenos do Tipo I ao XXVIII (GORDON; HAHN, 2010; KADLER et al., 2007; SHOULDERS; RAINES, 2009). Estes colágenos podem ser agrupados em:

- Colágenos fibrilares (*fibril-forming collagens*): são a principal fonte de resistência a tração em tecidos animais, formando fibras que podem ter comprimento entre 12 a 500 nm, dependendo da idade e desenvolvimento do tecido. Colágenos fibrilares contem em torno de 1000 unidades de repetição, ligados interruptamente (KADLER et al., 2007). Este grupo inclui os colágenos dos tipos I, II, III, V e XI. Colágenos do tipo I constituem mais de 90% da massa orgânica dos ossos, sendo também encontrados em tendões, pele, ligamentos, córnea e tecidos conjuntivos intersticiais. Os colágenos do Tipo I fornecem aos tecidos suporte à carga, resistência à tração e rigidez à torção. Colágenos do Tipo II são os principais constituintes das cartilagens hialinas, mas também estão presentes em outras partes do corpo, como no corpo vítreo dos olhos e no epitélio da córnea. Colágenos do Tipo III estão presentes na maioria dos tecidos em que o Tipo I está presente, com exceção dos ossos, sendo encontrados em tecidos intersticiais dos pulmões, fígado, derme e baço. Colágenos dos Tipos V e XI geralmente estão presentes em tecidos que contem colágenos dos Tipos I e II. Os do tipo V formam heterofibras com os tipos I e III e assim, estão presentes em ossos, córnea, músculos, fígado, pulmão e placenta. Os do tipo XI encontram-se largamente associados ao tipo II em cartilagens articulares (GELSE, K; PÖLSH, E; AIGNER, 2003).
- Colágenos associados a fibrilas com tripla hélices interrompidas (*fibril-associated collagens with interrupted triple helices*): são colágenos com cadeias relativamente curtas que se aderem à superfície dos colágenos fibrosos e tem a função de transportar outras moléculas (KADLER et al., 2007). A estrutura destes colágenos é caracterizada pela interrupção da tripla hélice com domínios de colágeno, por domínios não helicoidais. Os colágenos IX, XII, XIV, XVI, XIX, e XX possuem estas características. Como eles estão associados aos colágenos fibrosos, estão presentes nas estruturas já citadas anteriormente, como cartilagens e pele (GELSE, K; PÖLSH, E; AIGNER, 2003).
- Colágenos formadores de redes (*network-forming collagen*): bem como o nome diz, esta categoria é representada por colágenos que formam redes ou malhas interligadas. Um exemplo típico desta categoria é o colágeno IV, que formam redes em membranas basais, responsáveis por filtração molecular (GELSE, K; PÖLSH, E; AIGNER, 2003).
- Colágenos constituintes de fibrilas de ancoragem (*anchoring fibrils*): formam as fibrilas que estão abaixo da camada densa do epitélio; destacam-se nesta classe os colágenos do tipo VII (KADLER et al., 2007).

- Colágenos transmembranas (transmembrane colagens): possuem grande parte da estrutura helicoidal interrompida. São colágenos que atuam na adesão celular, podendo ser encontrados em células malignas. Fazem parte desta classe, colágenos dos tipos II e XVII, sendo que atualmente vários outros tipos de colágeno estão sendo caracterizados como colágenos transmembrana. As funções destas moléculas estão associadas a funções neurais, desenvolvimento dos olhos, modulação do fator de atividade de crescimento e também possuem funções na adesão celular (KADLER et al., 2007).
- Outros tipos de colágenos com funções especiais e específicas como, por exemplo, inibição de migração de células endoteliais, redução de crescimento de tumores em animais e formação de microfibrilas (KADLER et al., 2007).

As diferenças entre os vários tipos de colágeno estão relacionadas às estruturas, à presença de componentes não helicoidais, à quantidade de aminoácidos presentes nas cadeias polipeptídicas e às suas funções finais no organismo (GELSE, K; PÖLSH, E; AIGNER, 2003).

2.2 APLICAÇÕES DO COLÁGENO

Devido a sua grande disponibilidade e vantajosas propriedades físico-químicas e mecânicas, o colágeno vem sendo largamente utilizado para diferentes fins industriais. Para a maioria dos processos, o colágeno obtido de tendões ou pele de mamíferos (bovinos, equinos e suínos), sendo assim em sua maioria colágenos do Tipo I (MEYER; BALTZER; SCHWIKAL, 2010).

O colágeno pode ser utilizado em sua forma completa e intacta, como em couros, completamente degradado na forma de gelatinas ou parcialmente desnaturado. A lista de aplicações do colágeno é extensa, abrangendo diferentes setores industriais. Por exemplo, na indústria de alimentos, além das gelatinas, tem-se aplicação de colágeno na produção de filmes para embalagens comuns e embalagens comestíveis, e ossos artificiais para cães (KLÜVER; MEYER, 2013). Na área biomédica o colágeno também vem sendo utilizado em diversas formas e para diferentes aplicações: substratos porosos para reconstituição de tecidos (pele, ossos e tecidos do coração); hidrogéis injetáveis para reconstituição do miocárdio, substituição de derme, aplicações na córnea e para reconstituição de cartilagens; filmes para uso como barreira para proteger feridas do ambiente exterior, evitando assim

infecções (BROWNE; ZEUGOLIS; PANDIT, 2013); adesivos para uso médico (KLÜVER; MEYER, 2013).

Seu uso nas aplicações descritas acima pode ser explicado por sua atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta porosidade, fácil processamento, boa adesão celular, hidrofiliabilidade, facilidade de formar blendas, boa absorção corporal, capacidade de aguentar carga e mínima resposta imunológica (ZUBER et al., 2015).

Muitas das aplicações mencionadas nos parágrafos anteriores envolvem a modificação prévia do colágeno por meio de processos de desnaturação. Assim este tópico será discutido na seção seguinte.

2.3 DESNATURAÇÃO DO COLÁGENO

Os fatores mais importantes e desafiadores do uso do colágeno para fins industriais são sua purificação, modificação e processamento, que devem satisfazer os requerimentos do seu uso final. Colágenos são altamente resistentes a enzimas, sendo eficientemente degradados por collagenases ou proteases muito agressivas (BROWN, 2013).

Alguns usos do colágeno envolvem o uso direto da matéria prima purificada e moída, como no caso da produção de membranas porosas (MEYER; BALTZER; SCHWIKAL, 2010), ou a reticulação da estrutura por meio de reagentes químicos apropriados, como no caso do curtimento. No entanto, em muitos casos o processamento e/ou a aplicação final do colágeno requerem a desnaturação, pelo menos parcial, da proteína. Os métodos mais comuns de desnaturação envolvem tratamento químico ou térmico, sendo que recentemente têm sido introduzidos também alguns métodos termomecânicos de desnaturação.

Os meios químicos e bioquímicos mais utilizados para a desnaturação do colágeno são a digestão ácida e a digestão com pepsina, que levam à quebra parcial das ligações cruzadas da parte não helicoidal da estrutura da proteína (grupos terminais). A remoção das ligações cruzadas naturais da estrutura proteica torna essencial o uso de outras formas de manter a estrutura estável, seja por novas ligações cruzadas ou pelo uso de substâncias estabilizantes (BROWN, 2013; BROWNE; ZEUGOLIS; PANDIT, 2013; KLÜVER; MEYER, 2013; MEYER; BALTZER; SCHWIKAL, 2010).

Outro método importante de desnaturação do colágeno é o uso de temperaturas altas. Este processo também está intimamente ligado com a quebra das ligações de

hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas que formam a tripla hélice de colágeno. Um método simples de verificar a quebra destas ligações é verificar a viscosidade com o aumento da temperatura. Pode-se observar, que em amostras de colágeno que ainda possuem ligações cruzadas, há uma grande variação no valor de viscosidade com o aumento da temperatura (entre a faixa de 25 e 50°C), enquanto que para amostras de gelatina, caracterizadas pela ausência de ligações cruzadas, a viscosidade varia muito pouco, se comparado com a variação da viscosidade do colágeno (ZHANG; LI; SHI, 2006).

Zhang, Li e Shi (2006) compararam a diferença entre amostras de colágeno provenientes de pele bovina com três diferentes métodos de tratamento: (i) extração do colágeno com pepsina em meio ácido; (ii) extração da gelatina em temperaturas altas, acima da de desnaturação (gelatina do tipo B); (iii) hidrólise com tripsina da gelatina do tipo B obtida no segundo método. Através de eletroforese foi observado que as amostras do processo (i) de extração possuíam massa molar mais uniforme e maior (300kDa), enquanto que as amostras provenientes dos métodos (ii) e (iii) possuíam massa molar menor que 300 e 50kDa, respectivamente, além de não possuir distribuição tão uniforme. Outro estudo realizado por Meyer, Mülbach e Harzer (2005) encontraram resultados similares para colágeno obtido por desnaturação ácida e gelatina do tipo B. Por análises de cromatografia por exclusão de tamanho, os autores observaram que a amostra de colágeno apresenta picos estreitos característicos das cadeias constituintes do colágeno do Tipo I, indicando uma faixa menor de distribuição de massas molares. Já para a gelatina do tipo B, encontram-se dois picos na mesma faixa que aqueles encontrados para a amostra de colágeno, porém muito mais largos, indicando uma maior faixa de distribuição de massas molares.

A explicação dos autores para tal comportamento é que a digestão em meio ácido e a digestão com pepsina atacam somente as ligações que não fazem parte da estrutura helicoidal das fibras de colágeno. Já no caso da gelatina, por utilizar temperaturas acima da de desnaturação das proteínas de colágeno, também quebram as ligações helicoidais e até mesmo algumas ligações peptídicas, resultando em menores massas molares. Já o hidrolisado de gelatina, além de ser obtido da gelatina, que já é um material bastante desnaturado, sofre uma etapa adicional de desnaturação, que leva a moléculas ainda menores (MEYER; MÜHLBACH; HARZER, 2005; ZHANG; LI; SHI, 2006).

A modificação termomecânica do colágeno pode ser realizada em misturadores internos ou extrusoras. Meyer, Mülbach e Harzer (2005) realizaram experimentos em que peles de bois, após tratamento preliminar, foram moídas e tratadas em misturadores internos por tempos diferentes. Foi observado que houve o aumento da temperatura do sistema ao longo do processamento no misturador. Além disto, as solubilidades em água dos materiais obtidos aumentaram com o aumento do tempo de processamento. Visto que o colágeno é praticamente insolúvel em água, o aumento da sua solubilidade indica a quebra de sua estrutura helicoidal. Os autores ainda observaram que as amostras obtidas apresentaram valores relativamente elevados de massa molar média e uma larga distribuição de massas molares, indicando que a quebra da cadeia de colágeno ocorre em posições aleatórias.

Em estudo relativamente recente, Klüver e Meyer (2013) realizaram a desnaturação de peles bovinas por: (i) aquecimento em água quente (80°); (ii) micro-ondas; (iii) extrusão. As técnicas (i) e (ii) baseiam-se na desnaturação térmica da proteína e a técnica (iii) utiliza desnaturação termomecânica. A análise por calorimetria diferencial de varredura dos materiais obtidos apresentou transições de desnaturação em temperaturas entre 30 e 37°C, o qual, segundo os autores, indica que a tripla hélice do colágeno foi destruída. Foram também realizadas análises de solubilidade das amostras produzidas, em que se verifica diferenças nos valores percentuais de material dissolvido, o que indica que as três técnicas de desnaturação empregadas desnaturam o colágeno em diferentes níveis. No entanto, os autores não apresentam dados da integração dos picos de DSC reportados, de modo que não é possível associar as diferenças de solubilidade diretamente com a quantidade de colágeno modificado durante cada um dos tratamentos.

Cabe ainda mencionar que além das características do método de desnaturação utilizado, o resultado deste processo depende também da origem do material base utilizado. Como exemplo, amostras de pele bovina e suína foram tratadas de forma a formar fios de maneira semelhante e o resultado encontrado para as amostras foi diferente. Enquanto as amostras provenientes de pele suína apresentaram estrutura filamentosa orientadas em paralelo, as amostras provenientes de pele bovina não apresentaram estrutura organizada, mas sim formas parecidas com novelos. Uma das possíveis explicações para isto é a provável diferença de idade entre as peles, visto que porcos são geralmente abatidos mais jovens do

que bois (MEYER; BALTZER; SCHWIKAL, 2010). Estes resultados evidenciam que a origem do colágeno utilizado deve ser levada em consideração quando se comparam resultados de caracterização de colágenos tratados por diferentes técnicas de desnaturação e/ou diferentes autores.

As próximas duas seções serão sobre análises reológicas. Para facilitar o entendimento do trabalho, primeiramente será feita uma revisão sobre termos de reologia e após será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os estudos reológicos já realizados até o momento para amostras de colágeno.

2.4 ENSAIOS REOLÓGICOS OSCILATÓRIOS EM REGIME LINEAR

Reologia é o estudo da deformação e escoamento da matéria. Uma classe importante de ensaios reológicos é a constituída pelos ensaios oscilatórios em regime linear.

No regime oscilatório, uma deformação dependente do tempo é aplicada a amostra conforme a equação a seguir:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (2.1)$$

onde $\gamma(t)$ é a deformação aplicada, γ_0 a amplitude da deformação utilizada, ω a frequência (rad/s) e t o tempo (s). Para materiais viscoelásticos, a tensão resultante é a soma das contribuições elásticas com as contribuições viscosas com um ângulo de defasagem entre 0 e 90°:

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (2.2)$$

onde $\tau(t)$ é a tensão (Pa), τ_0 a amplitude da tensão (Pa) e δ o ângulo de defasagem em relação a deformação (rad). Baseado nos componentes em fase e fora de fase, os materiais podem ser caracterizados pelo módulo de armazenamento em cisalhamento:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad (2.3)$$

e pelo módulo de perda em cisalhamento:

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad (2.4)$$

G' e G'' são medidas das energias armazenada e dissipada, respectivamente, em cada ciclo de deformação (BRETAS, ROSARIO E. S.; D'ÁVILA, 2005). Estes parâmetros são relacionados pelo chamado tangente do ângulo de fase, que é expresso por:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2.5)$$

2.5 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DE COLÁGENOS

A caracterização reológica de colágenos vem sendo extensivamente estudada na literatura. Os objetivos destes estudos incluem: (i) a obtenção de dados reológicos para desenvolvimento de novas técnicas de processamento e/ou melhoria das já existentes; (ii) a obtenção de informação sobre a estrutura dos colágenos processados; (iii) no caso particular de aplicação na área biomédica, o entendimento de como esta proteína se comporta no corpo humano, a fim de poder tratar doenças relacionadas a falhas nas estruturas formadas pelo colágeno.

Por isto, encontra-se uma ampla variedade de estudos reológicos de colágeno provenientes de diversas fontes diferentes, como pele de peixe (ZHANG et al., 2010), serosa e pele suína (SALOMÉ MACHADO; MARTINS; PLEPIS, 2002; YANG et al., 2016), tendões de rabo de rato (MOTTE; KAUFMAN, 2012), pele e tendão bovino (LAI; LI; LI, 2008; SUN et al., 2015) entre outros. Os estudos encontrados abrangem concentrações de colágeno entre 0,05% (MOTTE; KAUFMAN, 2012; YANG; KAUFMAN, 2009) e 20% (SUN et al., 2015) e diferentes métodos de desnaturação, como extração com pepsina (LAI; LI; LI, 2008; MOTTE; KAUFMAN, 2012), extração ácida (MOTTE; KAUFMAN, 2012; SALOMÉ MACHADO; MARTINS; PLEPIS, 2002) e extração alcalina (SUN et al., 2015). Nestes trabalhos, a caracterização reológica é feita em regime estacionário e/ou em regime oscilatório.

No caso de testes em regime estacionário, as propriedades mais estudadas são a viscosidade de cisalhamento e a viscosidade elongacional (DEIBER; PEIROTTI; OTTONE, 2011; KLÜVER; MEYER, 2013). Os testes oscilatórios são realizados tanto na região de viscoelasticidade linear (deformações pequenas), como em regime não linear (grandes deformações). Os testes a altas deformações permitem determinar os valores limites de deformação correspondentes ao ponto no qual a ação mecânica começa a provocar alterações (*critical strain*) ou quebra (*yield strain*) de estrutura no material. Em testes na região de viscoelasticidade linear os parâmetros reológicos mais utilizados são o módulo de armazenamento (G'), o módulo de perda (G'') e a viscosidade complexa (η^*), os quais podem dar informação mais direta sobre a estrutura do material analisado.

Com relação à caracterização reológica em estado estacionário, foram encontrados estudos realizados com colágeno provenientes de: (i) serosa porcina com extração em meio ácido e com meio básico (SALOMÉ MACHADO; MARTINS; PLEPIS, 2002); (ii) pele de porco,

hidrolisada em meio básico e ácido consecutivamente (DEIBER; PEIROTTI; OTTONE, 2011); (iii) pele de boi, tratada por meio térmico e por meio termomecânico (KLÜVER; MEYER, 2013). Todos os materiais apresentaram comportamento de pseudoplásticos, ou seja, diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação (DEIBER; PEIROTTI; OTTONE, 2011; KLÜVER; MEYER, 2013; SALOMÉ MACHADO; MARTINS; PLEPIS, 2002). Klüver e Meyer (2013), que realizaram a desnaturação do colágeno por banho em água quente e micro-ondas (tratamento térmico) e por extrusão (tratamento térmico mecânico), reportaram que os valores de viscosidade encontrados foram da mesma ordem que os de outros polímeros termoplásticos, sendo dependentes dos teores de água presentes nas misturas de água e colágeno. Ao analisarem as três amostras, observaram ainda que as amostras desnaturadas por extrusão possuíam, para uma mesma concentração, as menores viscosidades, seguidas das amostras desnaturadas por água quente e micro-ondas. Os autores afirmam que as causas para este comportamento não estão claras, porém propõem que as diferenças de viscosidade encontradas entre as amostras estariam associadas às diferenças de grau de desnaturação das mesmas, provenientes dos diferentes processos. Além dos testes com misturas somente de água e colágeno, os autores realizaram um teste para analisar o comportamento reológico do colágeno com a adição de glicerol, que evita que as misturas de água e colágeno ressequem. Os resultados indicaram que a adição de glicerol não altera significativamente os valores de viscosidade elongacional e de cisalhamento das amostras de colágeno.

Com relação à aplicação de testes oscilatórios a altas deformações no estudo de colágenos, os principais resultados na literatura indicam que o tipo de colágeno utilizado e os processos de desnaturação utilizados alteram os valores de deformação crítica e de deformação de ruptura (KURNIAWAN; WONG; RAJAGOPALAN, 2012; MOTTE; KAUFMAN, 2012; SUN et al., 2015; YANG et al., 2016). Motte e Kaufman (2012) analisaram colágenos provenientes de tendões de rato de pele bovina desnaturados em meio ácido e por pepsina, respectivamente. Os autores observaram que a deformação crítica e de ruptura sofreu influência da fonte da qual o colágeno foi extraído, da temperatura em que ocorre a formação da estrutura dos materiais (gelificação) e das concentrações de amostra utilizados (MOTTE; KAUFMAN, 2012; VADER et al., 2009). Motte e Kaufman (2012) e Yang et. al (2016) mostraram que os valores das deformações crítica e de ruptura também podem ser

alterados pelo uso de agentes formadores de ligações cruzadas, como glutaraldeído e genipina, por exemplo.

Testes oscilatórios na faixa de comportamento linear das amostras de colágeno são os mais comumente encontrados na literatura. Para este tipo de testes, assim como os demais apresentados, observa-se que os diferentes tipos de colágeno, que variam conforme material base utilizado e o método de desnaturação empregado, apresentam comportamentos similares, porém os valores dos parâmetros reológicos encontrados variam conforme a amostra. Para varreduras de frequência, colágenos de pele de peixe desnaturados com pepsina (ZHANG et al, 2010), colágeno de tendão bovino cujo tipo de desnaturação não é mencionado (FRIESS, W; SCHLAPP, 2001) e colágeno de pele de boi desnaturado com pepsina (LAI; LI; LI, 2008) apresentam comportamento pseudoplástico ou *shear thinning* (i.e., viscosidade complexa diminuindo com o aumento da frequência) na faixa de frequências estudadas (de aproximadamente 0,1 a 100 rad/s). Além disto, os valores de G' , G'' e η^* se mostram dependentes da concentração, sendo que quanto maior a concentração das soluções maiores os seus valores (FRIESS, W; SCHLAPP, 2001; LAI; LI; LI, 2008). Friess e Schlapp (2001) usaram varreduras de frequência para mostrar a diminuição da viscosidade e o aumento da flexibilidade de colágenos bovinos na estrutura fibrilar com o aumento da temperatura. Lai, Li e Li (2008) e Zhang et al (2010) fizeram varreduras de frequência a diferentes temperaturas para colágeno bovino e pele de peixe, respectivamente, ambos extraídos com pepsina. Nos dois trabalhos os autores verificaram alterações no padrão das curvas de G' versus ω e G'' versus ω com o aumento da temperatura e as relacionaram com modificações químicas experimentadas pelos materiais, observando uma perda de regularidade nestas curvas para temperaturas nas quais o nível de degradação estrutural passa a ser muito elevado. As temperaturas nas quais aconteceu esta perda de regularidade foram de 32,5°C para o colágeno bovino e de 27,5°C para o de pele de peixe.

Para colágenos desnaturados por meio térmico ou termomecânico não foram encontrados estudos em que testes oscilatórios dinâmicos foram realizados, cujos resultados poderiam indicar possíveis diferenças estruturais das amostras obtidas por estes diferentes processos, mostrando-se assim a necessidade de caracterização destes materiais por estas técnicas de análise.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os colágenos de pele bovina desnaturados foram gentilmente cedidos pelo Prof. Michael Meyer, do *Research Institute of Leather and Plastic Sheeting* – FILK. Foram utilizados três colágenos, obtidos a partir dos seguintes métodos de desnaturação: por aquecimento em água a 80°C (AQ), por micro-ondas (MO) e por extrusão (EX). A metodologia de desnaturação utilizada em cada caso foi descrita por Klüver e Meyer (2013).

3.2 ANÁLISES REOLÓGICAS

3.2.1 Desenvolvimento da metodologia de preparação das amostras

Os colágenos utilizados apresentaram características físico-mecânicas bastante diferentes de outras amostras previamente analisadas no Laboratório de Tecnologia e processamento de Polímeros, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo desconhecidos os procedimentos necessários para sua plastificação nas quantidades requeridas. Neste sentido, cabe salientar que os procedimentos de plastificação propostos por Klüver e Meyer (2013) são aplicáveis somente para grandes quantidades de material, por incluírem uma etapa de extrusão. Assim, a primeira etapa do trabalho consistiu no desenvolvimento de um procedimento que permitisse a plastificação adequada das amostras para a análise reológica. Um resumo dos procedimentos testados é apresentado na Tabela 3.1, sendo que os resultados obtidos em cada caso serão apresentados e discutidos na Seção 4.1. Os números que aparecem ao lado das denominações das amostras (AQ, MO e EX) indicam a porcentagem em massa de água utilizada.

Após a plastificação das amostras, foi também necessário o desenvolvimento de um procedimento para preparo do corpo de prova para a análise reológica, cujo resumo das estratégias estudadas segue na Tabela 3.2.

Tabela 3.1 – Procedimentos testados no desenvolvimento da metodologia de plastificação das amostras

ESTRATÉGIA	DESIGNAÇÃO	AMOSTRAS
Mistura a temperatura ambiente de água e pó de colágeno	MTA	AQ60, MO60, EX60
Aquecimento da amostra em chapa elétrica entre 80 e 90°C	ACE	AQ60, MO60, EX60
Aquecimento da amostra em forno por 15 minutos a 83°C	AF	AQ60, MO60, EX60, AQ70, MO70, EX70, AQ80, MO80, EX80
Aquecimento em forno por 15 minutos a 83°C seguido de cisalhamento com seringa	AF+CS	AQ80
Análise do tempo ideal de aquecimento (amostras deixadas em forno e analisada visualmente de 15 em 15 minutos)	ATI	AQ60, MO60, EX60
Aquecimento de mistura de 60% em forno por 15 minutos, com posterior adição de água a temperatura ambiente para completar concentração desejada	AFAF	EX70 E MO70
Aquecimento de mistura de 60% em forno por 15 minutos, com posterior adição de água a 85°C para completar concentração desejada	AFAQ	MO70

Tabela 3.2 – Procedimentos testados para preparação das amostras para análise reológica

ESTRATÉGIA	DESIGNAÇÃO	AMOSTRAS
Análise da amostra sem preparo de corpo de prova	AD	AQ60, MO60, EX60, AQ70, MO70, EX70, AQ80, MO80, EX80
Prensagem da amostra, após retirada do forno, entre pratos de 50mm do reômetro e corte com auxílio de molde circular vazado de 25mm	PPTA	AQ60, MO60, EX60
Prensagem da amostra, após ser retirada do forno, entre pratos de 50mm do reômetro pré-aquecidos a 90°C e corte com auxílio de molde circular vazado de 25mm	PPQ	AQ60, MO60, EX60

3.2.2 Condições de teste

Três testes reológicos a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ foram realizados por amostra preparada: varredura de frequência a 3% de deformação, varredura de deformação a frequência de 500 rad/s e novamente varredura de frequência a 3% de deformação. Estes testes foram realizados em reômetro Ares com geometria de placas paralelas de 25mm e o processamento dos dados foi realizado com o Software RSI Orchestrator, próprio do equipamento.

Para a concentração de 80% de água também foram realizadas análises para cada um dos colágenos em um segundo reômetro da marca Gemini, utilizando geometria de placas paralelas de 20mm. Neste caso, o processamento dos dados foi realizado utilizando o Software Bohlin, próprio do equipamento. Neste reômetro as análises realizadas foram: varredura de frequência a 1% de deformação, varredura de deformação a frequência de 100 rad/s e novamente varredura de frequência a 1% de deformação, em sequência.

A nomenclatura utilizada para cada repetição seguiu ordem alfabética, assim por exemplo, a primeira repetição testada da amostra AQ foi a A, a segunda B e assim por diante. Esta nomenclatura será utilizada posteriormente na descrição dos resultados.

3.3 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Adicionalmente aos testes reológicos, foram realizadas análises de DSC nos três colágenos com taxas de aquecimento de 10 e $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (DSC600, Perkin Elmer), calibrado com índio. As análises foram realizadas com aproximadamente 0,3 g de amostra em suportes hermeticamente selados.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada no software Statistica, utilizando o teste de Tukey, com um grau de confiança de 95%. Nos testes reológicos, analisaram-se três pontos das varreduras de frequência obtidos (500, 25,5 e 1,25 rad/s).

3.5 PERCENTUAL DE EVAPORAÇÃO DE ÁGUA DURANTE AQUECIMENTO

Realizaram-se também avaliações do percentual de água evaporado durante o aquecimento em forno para as amostras com teores de água de 60%, que consistiu na pesagem das amostras antes e após a etapa de aquecimento.

4 RESULTADOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E CONDIÇÕES DE TESTE

As estratégias testadas no desenvolvimento da metodologia de preparo das amostras podem ser divididas entre aquelas em que água e colágeno são misturados nas proporções corretas em uma só vez (MTA, ACE, AF e AF+CS) e aquelas em que a obtenção da mistura nas frações de água desejadas é realizada através da adição fracionada da quantidade de água necessária (AFAF e AFAQ). Os principais resultados obtidos nos testes realizados com estas estratégias são resumidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos no desenvolvimento da metodologia de preparação das amostras

DESIGNAÇÃO ¹	RESULTADOS OBTIDOS	USADO/DESCARTADO
MTA	Mistura heterogênea; a água pareceu ficar entre as partículas de sólido	Descartado
ACE	Mistura foi plastificada, mas o método de aquecimento não foi homogêneo para todo sistema	Descartado
AF	Aqueceu homogeneamente o sistema	Usado
AF+CS	Resultado obtido é o mesmo que o obtido com AF	Descartado
ATI	Um tempo de 15 minutos foi suficiente para atingir o nível máximo de plastificação ²	Usado ³
AFAF	Atingiu-se plastificação para a amostra EX70, mas não para a MO70	Descartado
AFAQ	Amostra não plastifica sem etapa de aquecimento adicional após segunda adição de água	Descartado

NOTAS:

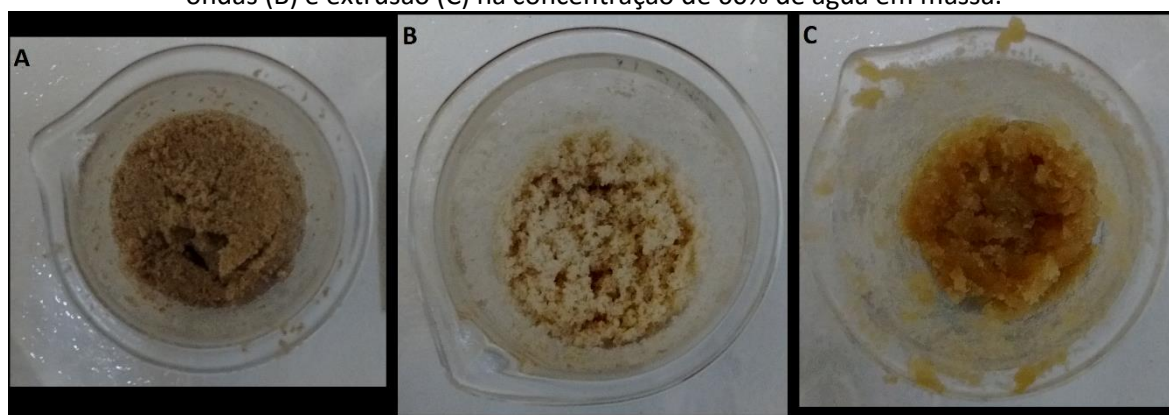
¹Ver Tabela 3.1 para a descrição mais detalhada de cada procedimento.

²Em 30 minutos de ensaio, a amostra EX60 se encontrava como anteriormente, enquanto que as amostras AQ60 e MO60 se encontravam ressecadas. Em 45 minutos todas as amostras se encontram ressecadas e difíceis de misturar enquanto que em 60 minutos já não era mais possível misturá-las.

³Este resultado foi utilizado para otimizar o tempo de aquecimento em forno das amostras.

No caso da estratégia MTA, observou-se que para os colágenos AQ e MO as amostras obtidas ficaram em forma de flocos, enquanto que o colágeno EX tornou-se pastoso, porém contendo ainda partículas de colágeno não homogeneizadas. Também foi verificado que, nas estratégias testadas, a etapa de aquecimento foi essencial para a plastificação dos colágenos, visto que ela ocorre somente nas metodologias em que houve aquecimento das misturas após adição de água. A Figura 4.1 mostra o aspecto visual das amostras preparadas pela estratégia MTA.

Figura 4.1 - Misturas obtidas com colágeno obtido por desnaturação em água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C) na concentração de 60% de água em massa.



Ao utilizar a metodologia AF+CS, verificou-se que o resultado final obtido é muito semelhante àquele obtido somente com o aquecimento da amostra. Por isto, optou-se por descartar o uso da estratégia AF+CS, pois ela provavelmente levaria a maior variabilidade nos resultados reológicos devido à sua maior complexidade de processamento, quando comparada a estratégia AF.

Por outro lado, a comparação das metodologias AF e AFAF foi feita com base em testes reológicos preliminares. Estas duas metodologias não levaram a diferenças significativas para o colágeno MO, enquanto que para o colágeno EX, observou-se um aumento do módulo de armazenamento em cisalhamento (G') nas amostras AFAF. Tal diferença pode ser explicada em termos de uma maior quantidade de água evaporada na metodologia AFAF, devido à utilização de duas etapas de aquecimento. A metodologia AFAQ foi testada para o colágeno MO, não levando a diferenças de resultados com relação a AF e AFAF.

Assim, optou-se por utilizar para todas as amostras em todas as concentrações a estratégia AF. Esta metodologia consiste na mistura manual com espátula de aço nas

proporções necessárias de água e pó de colágeno, seguida da etapa de aquecimento em forno por 15 minutos a 83°C.

4.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS ENSAIOS REOLÓGICOS

Os resultados obtidos nos testes das metodologias avaliadas para a obtenção do corpo de prova para os ensaios reológicos são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultados obtidos no teste das estratégias de preparação das amostras para análise reológica

DESIGNAÇÃO	RESULTADOS OBTIDOS ¹
AD	Adequada para as concentrações de 70 e 80%, porém problemas de não uniformidade e descontinuidades volumétricas para a concentração de 60%
PPTA	Corpos de prova adequados ²
PPQ	Corpos de prova adequados

NOTAS:

¹Foram considerados adequados para a realização de testes reológicos aqueles corpos de prova para os quais se obteve espessura uniforme e que não apresentaram descontinuidades volumétricas.

²Esta estratégia foi descartada pois posteriormente observou-se que ao se pré-aquecer os pratos de 50 mm do reômetro, obtém-se mais facilmente amostras com espessura uniforme e sem descontinuidades volumétricas

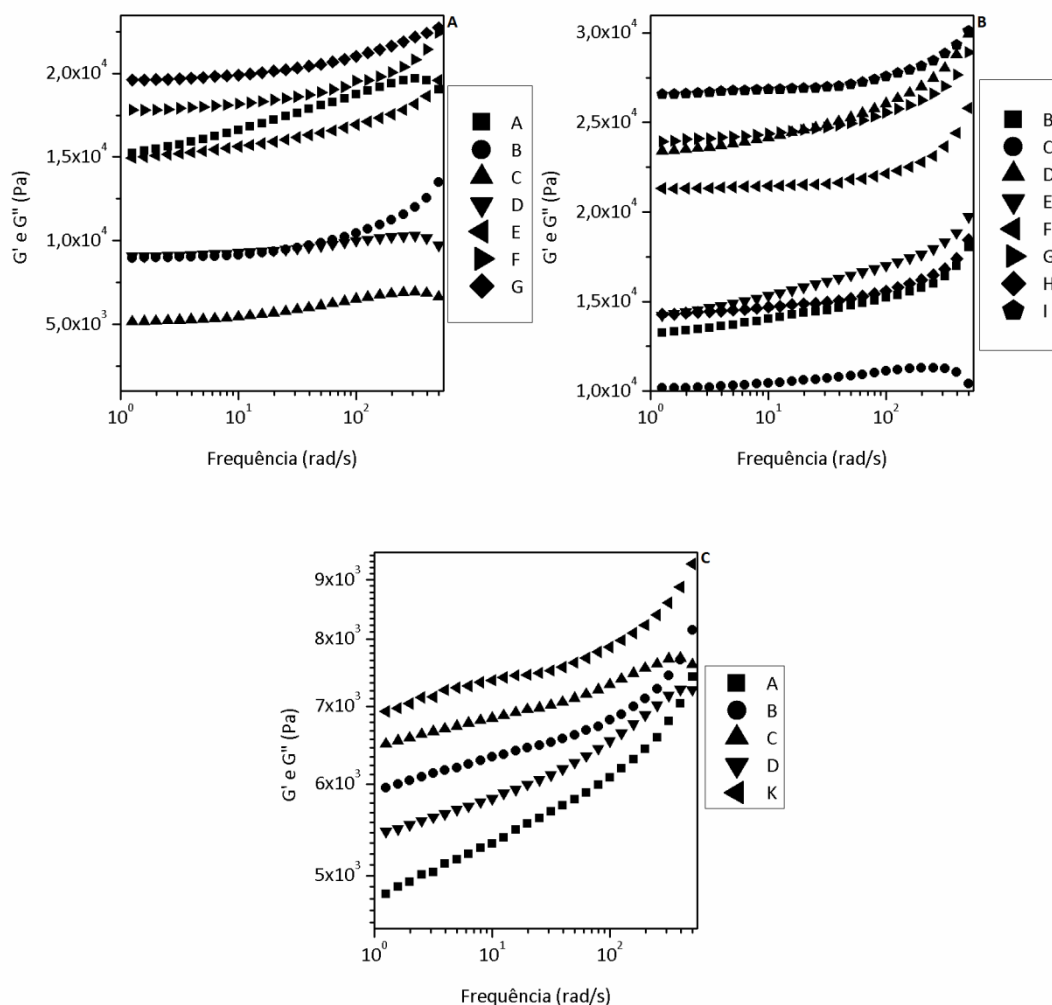
A estratégia AD apresenta a vantagem de ser mais simples e rápida. Por este motivo, ela foi utilizada para as amostras com teores de água de 70 e 80% (AQ70, MO70, EX70, AQ80, MO80 e EX80), para as quais foi possível deformar adequadamente a amostra inicial, diretamente no equipamento, até atingir o formato final requerido para o teste reológico.

As amostras com 60% de água não foram fluidas o suficiente para permitir o espalhamento regular durante a aproximação dos pratos do reômetro ou os passos intermediários de retirada do excesso de amostra. Assim, para estas amostras testaram-se as estratégias PPTA e PPQ, em que a estratégia PPQ é uma melhoria da PPTA, pois permite que a amostra fique menos viscosa por mais tempo, levando a corpos de prova mais homogêneos na totalidade de seu volume. Por isto, para a concentração de 60% de água foi adotada a metodologia PPQ.

4.3 ANÁLISES REOLÓGICAS: REPETITIVIDADE E DEFINIÇÃO DE CRITÉRIOS PARA AVALIAR A CONFIABILIDADE DE RESULTADOS

A Figura 4.2 apresenta os resultados de todos os testes reológicos realizados para as amostras com 60% de água (AQ60, MO60 e EX60). Observa-se que a variabilidade dos resultados foi bastante elevada, principalmente para as amostras AQ60 e MO60. A amostra EX60 apresentou variabilidade bem menor, permitindo o cálculo de valores médios confiáveis sem o descarte de amostras, a não ser pelo critério de formato das curvas que será discutido mais adiante. A menor variabilidade apresentada nos testes com esta amostra está relacionada com o fato de que esta amostra, por ser menos viscosa, foi mais fácil de ser processada, tornando mais fácil a obtenção de discos com distribuição volumétrica uniforme.

Figura 4.2 - Módulos de perda em cisalhamento para todas as repetições realizadas para os colágenos com 60% de água, desnaturados por água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C) à 25°C.



Para as amostras AQ60 e MO60, a excessiva variabilidade de resposta entre testes gerou a necessidade de estabelecimento de critérios de seleção dos resultados a incluir nos cálculos finais de média.

O primeiro destes critérios baseou-se na magnitude dos valores de G' obtidos nos diferentes testes. Neste sentido deve-se lembrar de que a obtenção de corpos de prova para as amostras com teores de água de 60% foi laboriosa e difícil, gerando frequentemente problemas de não uniformidade e de descontinuidades volumétricas. Estes problemas foram minimizados ao optar-se pela estratégia de preparação PPQ, no entanto não se pode afirmar que eles foram totalmente eliminados. Assim, levando em conta que os valores de G' são diretamente proporcionais a área da amostra em contato com os pratos do reômetro (BRETAS, ROSARIO E. S.; D'ÁVILA, 2005), espera-se que amostras que apresentem este tipo de falha apresentem valores de G' artificialmente menores que os reais. Desta forma, assumiu-se que as repetições com maiores valores de G' eram as mais acuradas.

O segundo critério utilizado, neste caso para as três amostras em questão, baseou-se no formato das curvas de G' versus ω . Podemos observar na Figura 4.2 que algumas repetições para as amostras AQ60, MO60 e EX60 (repetições A, C e D do colágeno AQ, para a repetição C do colágeno MO e para a repetição C e D do colágeno EX) apresentam diminuição de G' com o aumento da frequência na região de altas frequências (frequências maiores que aproximadamente 300rad/s). Este comportamento não é esperado do ponto de vista teórico (MACOSKO, 1993) e também não foi observado em medidas feitas com outros tipos de colágeno (FRIESS, W; SCHLAPP, 2001; SALOMÉ MACHADO; MARTINS; PLEPIS, 2002; YANG et al., 2016). Consequentemente, as amostras que apresentaram este comportamento não foram incluídas nos respectivos cálculos de média, considerando que a mencionada diminuição de G' possa ter sido decorrente de má adesão da amostra aos pratos ou de amplificação do efeito de falhas volumétricas na amostra.

Para as amostras com 70 e 80% de água a plastificação foi mais fácil e, consequentemente, o tempo requerido para o procedimento completo de preparação da amostra e ajuste das dimensões finais na geometria de teste foi mais rápido. Por isto, estas amostras apresentaram, em geral, menor variabilidade nos resultados dos testes reológicos que as amostras com 60% de água. Os resultados completos das amostras com teores de água de 70 e 80% são apresentados no Apêndice A, para fins de consulta.

As repetições utilizadas no cálculo das médias das amostras, considerando os critérios descritos anteriormente, são apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Escolha das repetições utilizadas no cálculo das médias dos resultados obtidos no reômetro Ares

Amostra	Repetição considerada
AQ60	E, F e G
MO60	D, F, G e I
EX60	A, B e K
AQ70	H, I e J
MO70 ¹	J, K, L e M
EX70	G, H e I
AQ80	K, L e M
MO80	N, O e P
EX80	Não aplicável

NOTAS:

¹Foram utilizadas todas as repetições utilizadas, obtidas pelas metodologias AF, AFAF e AFAQ, já que a metodologia utilizada não pareceu ter influência expressiva nos valores dos parâmetros reológicos.

4.4 ANÁLISES REOLÓGICAS: EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO E DO TIPO DE COLÁGENO

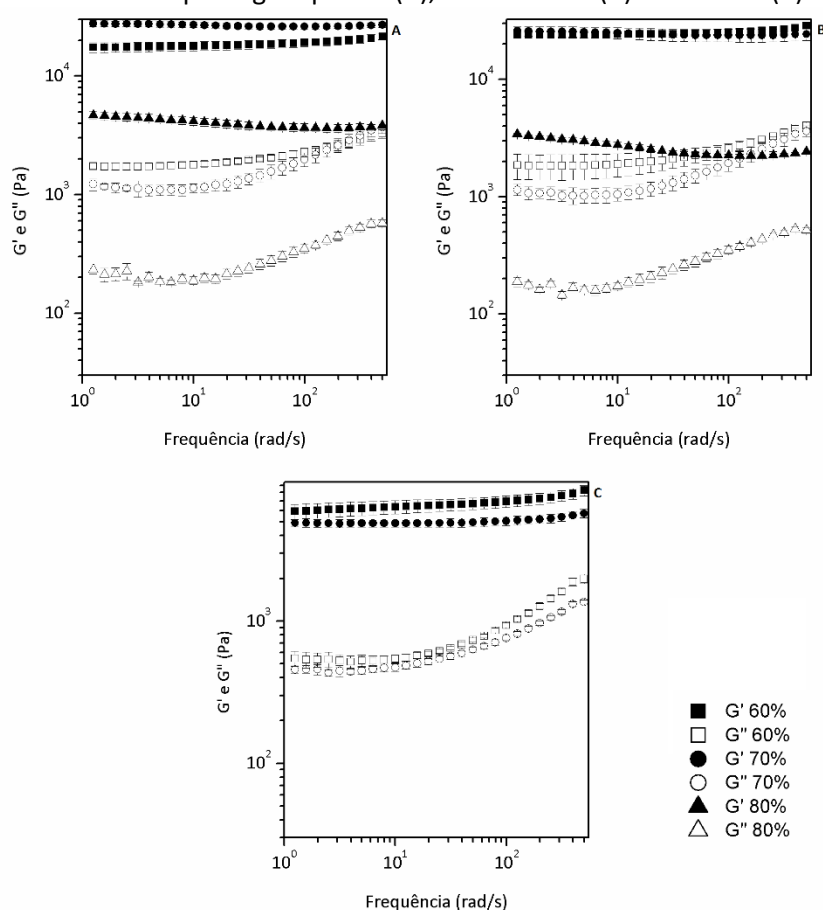
Todas as varreduras de frequência realizadas neste trabalho foram feitas na faixa de comportamento viscoelástico linear, que foi determinada por meio de varreduras de deformação. Para cada repetição, varreduras de deformação foram realizadas, comprovando-se assim, que as deformações utilizadas nas varreduras de frequência (de 3% para o reômetro Ares e 1% para o reômetro Gemini) estão dentro da faixa de comportamento viscoelástico linear das amostras (Apêndice B).

4.4.1 Comparação entre concentrações para os mesmos colágenos

Na Figura 4.3 são apresentados os valores médios de G' e G'' com seus respectivos desvios, para cada colágeno nas diferentes concentrações testadas, com base nas repetições listadas na Tabela 4.3. Analisando este gráfico podemos constatar que os valores de G' para todo o intervalo de frequências testado é maior que os valores de G'' , indicando comportamento predominantemente elástico das amostras. Além disso, o fato de G' ter apresentado variação muito pequena na faixa de frequência considerado e o formato das

curvas de G'' versus ω indicam que na faixa de concentração estudada todas as soluções de colágeno apresentaram uma estrutura de rede tridimensional reticulada similar ao que se observa em borrachas (MACOSKO, 1993). Não foram encontrados estudos reológicos para misturas de colágeno e água nas concentrações de 60, 70 e 80%, sendo encontrado apenas um estudo para amostras de gelatina proveniente de uma mistura de pele bovina e suína, na concentração de 81% de água. Para a gelatina na faixa de frequência entre 0,1 e 100 rad/s e com γ_0 igual a 5%, G' permanece praticamente constante em valor entre 1000 e 1100 Pa e G'' nesta mesma faixa de frequências varia entre 100 e 110 Pa. (SUN et al., 2015) Para as amostras AQ e MO foram encontrados valores de G' entre 3600 e 4700 Pa e entre 2400 e 3400 Pa, respectivamente. A diferença nos valores encontrados por Sun et. al (2015) e pelo presente estudo se devem provavelmente ao tipo e grau de desnaturação das amostras e também pelas diferentes fontes de colágeno utilizadas. Porém, como gelatinas são os compostos com maior grau de desnaturação provenientes do colágeno, valores maiores de G' já eram esperados para as amostras do presente estudo.

Figura 4.3 - Respostas reológicas para as diferentes concentrações testadas para amostras desnaturadas por: água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C).

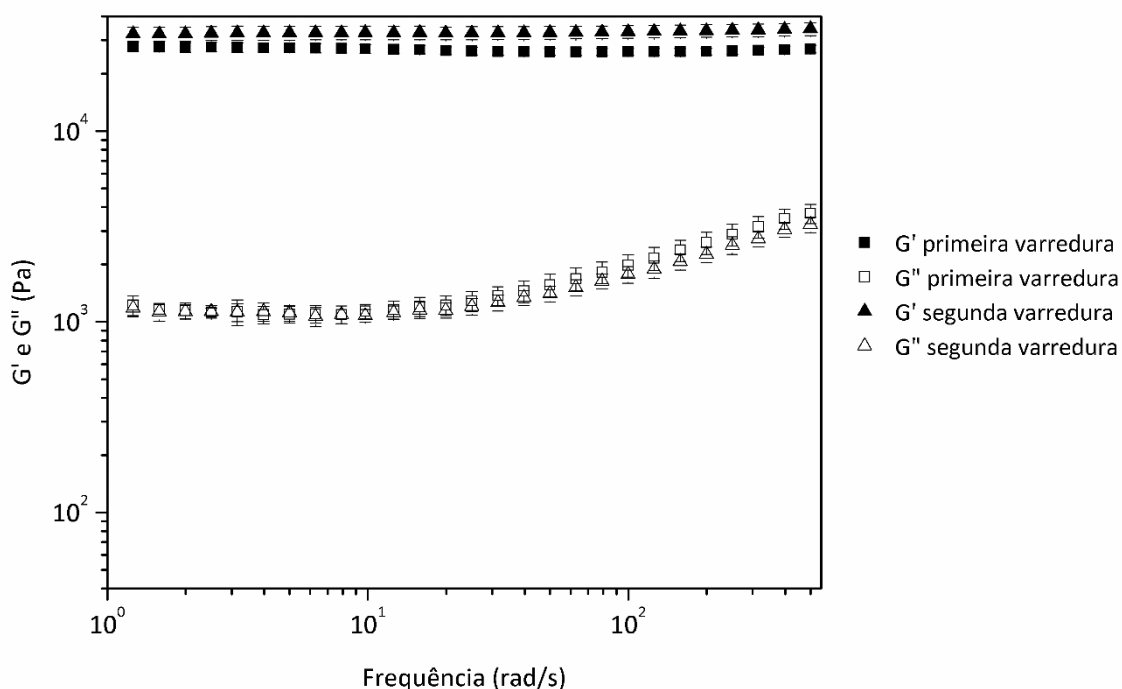


Nas análises das amostras com teores de água de 70 e 80%, observa-se que G' diminui suavemente com o aumento da frequência. Esta tendência é contrária à encontrada para outros tipos de colágeno e outras faixas de concentração, nos quais G' tende a aumentar suavemente com o aumento da frequência (LAI; LI; LI, 2008; SALOMÉ MACHADO; MARTINS; PLEPIS, 2002; SUN et al., 2015). Portanto, se faz necessário avaliar se a tendência encontrada é real ou o resultado de alguma limitação da metodologia estabelecida. Neste sentido, um aspecto a considerar é o efeito da variação da temperatura da amostra durante o teste. No estabelecimento da metodologia, buscando um compromisso entre variação de temperatura durante o teste e diminuição de tempo de acondicionamento da amostra, a fim de evitar excessiva perda de água por evaporação, as varreduras de frequência iniciavam geralmente em torno de 27°C, terminando em torno de 24,5°C, trabalhando-se assim com uma variação de temperatura que para outros tipos de medida e de materiais não tem um efeito apreciável sobre os valores medidos. Assim, foi feita a análise das varreduras de frequência consecutivas realizadas em uma mesma amostra.

A comparação de varreduras de frequência consecutivas foi feita para todas as amostras, sendo que, em geral, se observou o comportamento encontrado na Figura 4.4 para a amostra MO70 (para as demais amostras os resultados são apresentados no Apêndice C). Nota-se que a dependência de G' com a frequência altera-se da primeira para a segunda varredura, sendo que na segunda tem-se o aumento de G' com a frequência como reportado nos trabalhos previamente citados. Isto indica que o resultado da primeira varredura ainda está sendo afetada pelas variações que a amostra sofre durante a primeira varredura, podendo refletir um efeito da variação de temperatura mencionada anteriormente ou da evaporação parcial do conteúdo de água da amostra. Isto indica que a metodologia utilizada deve ainda ser melhorada, de maneira a minimizar ou permitir a quantificação de tais efeitos. Deve-se ainda ressaltar que a dependência de G' com a frequência é especialmente crítica com relação aos efeitos da alteração da temperatura ou da evaporação de água, pelo fato de que a variação de G' na faixa de frequências considerada é bastante baixa. Assim, para outros aspectos, como a comparação de médias entre as diferentes amostras ou a variação de G'' com a frequência tal efeito não exerce um papel tão importante. Isto pode ser visto também na Figura 4.4, analisando as curvas de G''

para a primeira e a segunda varredura, que apresentam uma pequena diferença na região de alta frequência, porém sem inversão de comportamento, como nas curvas de G' .

Figura 4.4 – Resultados médios das varreduras de frequência consecutivas obtidas para a amostra MO70.



Para todos os colágenos e em toda faixa de frequência testada, as amostras com teores de água de 80% apresentaram valores de G' muito inferiores do que aqueles apresentados para os mesmos colágenos nas concentrações de 60 e 70%. Este comportamento está de acordo com o fato que G' é um parâmetro indicativo da resposta elástica dos materiais, tendendo a diminuir com a diluição do sistema.

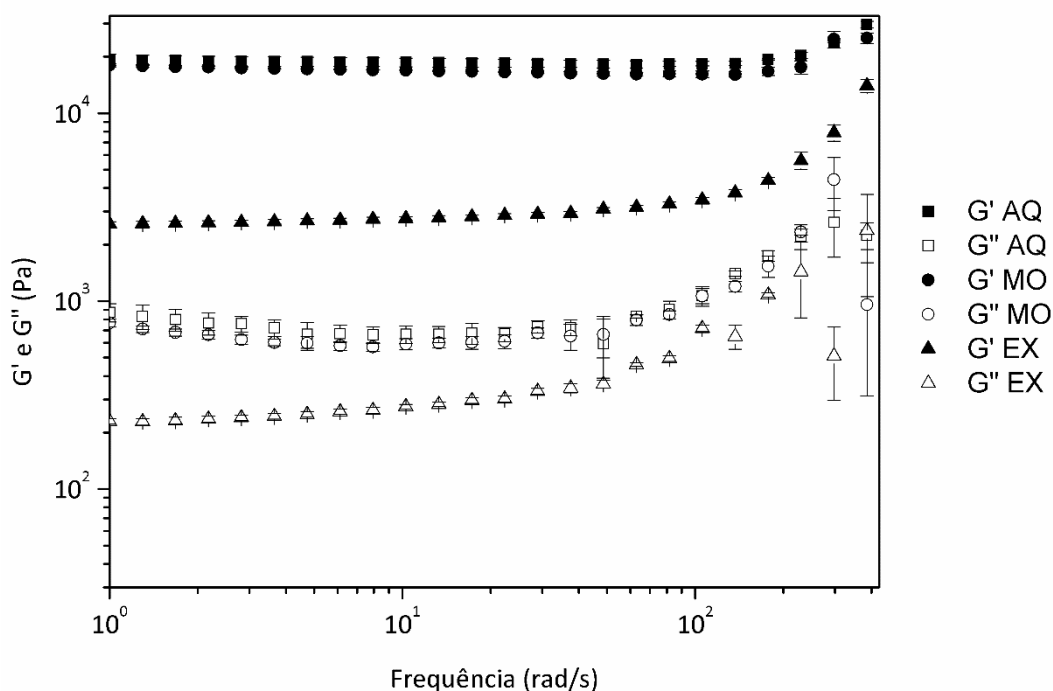
Entretanto, a diferença dos valores de G' entre as concentrações de 60 e 70% de água são significativamente menores que as diferenças encontradas entre as concentrações de 70 e 80% (análises estatísticas apresentadas no Apêndice E). Além disto, nas concentrações de 60 e 70% de água, a variação de G' não foi a mesma para os três colágenos, sendo que, por exemplo, para o colágeno AQ, os maiores valores de G' foram encontrados para a amostra AQ70, enquanto para o colágeno EX este comportamento se inverteu. Acredita-se que a menor diferença dos valores de G' entre as concentrações de 60 e 70% de água e o comportamento anômalo em termos de variação das propriedades com a concentração se deva às diferenças com relação ao modo de preparo das amostras e/ou às

dificuldades de plastificação observadas para as amostras com concentração de 60%, o que, como discutido na Seção 4.3, levava a falhas visualmente identificáveis em alguns corpos de prova. Sendo assim, é possível que em alguns casos possa ter ocorrido falhas no corpo de prova que não tenham sido identificadas visualmente, mas que podem levar a valores menores de G' do que os reais. Ainda, por análises preliminares observou-se que as amostras com teores de água de 70% apresentam maiores percentuais de evaporação e água durante a etapa de aquecimento, o que conseqüentemente leva a maiores valores de G' . Portanto, estes resultados também apontam para a necessidade de melhorar a metodologia estabelecida, a fim de aumentar a confiabilidade dos resultados.

Por último, cabe mencionar que não foi possível analisar a amostra EX80 com o reômetro Ares, pois a mesma não produziu torque suficiente para entrar na faixa de sensibilidade do equipamento. Por isto, para as amostras com concentração de 80% de água foram realizadas análises adicionais no reômetro Gemini, cujos resultados são apresentados na Figura 4.5. Os resultados apresentados nestes reômetro são qualitativamente iguais aos apresentados pelo reômetro Ares, porém quantitativamente diferentes. Por exemplo, na frequência de aproximadamente 63 rad/s, os valores de G' para o colágeno AQ são 18245 e 3707,6 Pa, no reômetro Gemini e no reômetro Ares, respectivamente. Já para o colágeno MO os valores nesta mesma frequência para o reômetro Gemini e Ares são 15800 e 2276 Pa, respectivamente. Além disso, nas varrerudas realizadas com o reômetro Gemini, foi observada uma instabilidade na medida para frequências próximas a 500 rad/s. Os valores de G' e G'' na frequência de 500 rad/s não foram incluídos na Figura 4.5, para facilitar a visualização dos demais valores, mas podem ser vistos no Apêndice D.

A diferença dos valores de G' encontrados entre os dois reômetros e a instabilidade do reômetro Gemini em altas frequências devem ter ocorrido devido a problemas de calibração do reômetro Gemini, visto que ele é um equipamento novo no laboratório, que estava em fase de instalação e foi utilizado pela primeira vez no presente trabalho. Assim, os resultados obtidos indicam que ainda deve ser feita uma calibração cuidadosa do equipamento, o que não pode ser feito no âmbito do presente trabalho, devido aos prazos envolvidos. Portanto, os resultados obtidos com o reômetro Gemini não serão utilizados como base de análise.

Figura 4.5 – Resultados médios das análises reológicas utilizando reômetro Gemini para amostras com teores de água de 80% para colágenos desnaturados por: água quente, micro-ondas e extrusão.

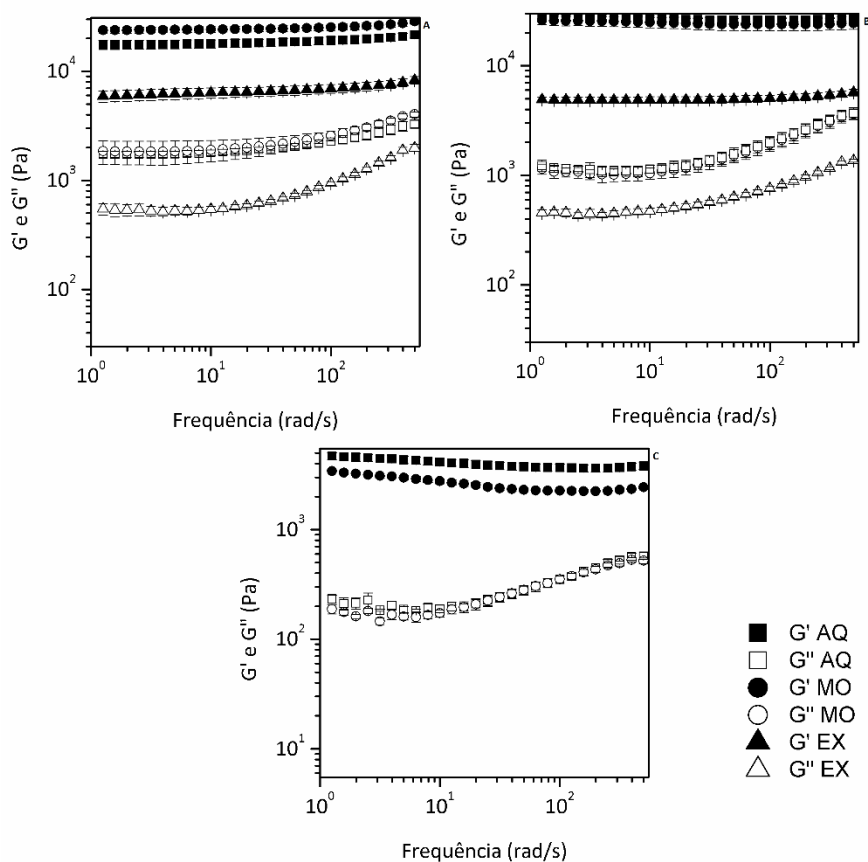


4.4.2 Diferenças entre as amostras de colágeno

A Figura 4.6 apresenta os resultados reológicos obtidos para os mesmos teores de água, comparando as diferentes amostras de colágeno. Como pode-se observar, para uma mesma concentração, os comportamentos reológicos dos colágenos são similares entre si, porém com diferenças nos valores dos parâmetros reológicos entre os mesmos. Para todas as concentrações (exceto a de 80% de água em que não foi realizada análise da amostra EX), observa-se que há diferença significativa nos valores de G' entre a amostra EX e as demais, indicando diferenças estruturais mais acentuadas entre este colágeno e os demais. Comparando-se as amostras AQ e MO, tem-se valores de G' muito próximos para ambas, sendo inclusive estatisticamente iguais para teores de 70% de água (os resultados das análises estatísticas se encontram no Apêndice E).

As diferenças encontradas entre os colágenos nas análises em regime dinâmico estão em concordância com os resultados obtidos por Klüver e Meyer (2013) por reometria em regime estacionário para os mesmos colágenos estudados no presente trabalho, os quais indicaram diferenças nos valores de viscosidade elongacional e de cisalhamento dos três tipos de colágeno.

Figura 4.6 – Valores médios encontrados nas varreduras de deformação utilizando o reômetro Ares para teores de água de (A) 60%, (B) 70% e (C) 80%.



Klüver e Meyer (2013) propuseram que estas diferenças estão relacionadas aos diferentes métodos de desnaturação utilizados, propondo que a desnaturação por extrusão tende a ser mais efetiva na quebra da proteína do colágeno, podendo leva-la a ter maior afinidade com a água. Esta maior afinidade com a água também poderia explicar a mais fácil homogeneização da amostra EX e a menor evaporação de água desta amostra durante a etapa de aquecimento em forno, que é pode ser observada na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Percentual de água evaporada na etapa de aquecimento das amostras, com concentrações de 60% de água

Amostra	% de água evaporado
AQ	6,70
MO	9,40
EX	5,90

Na tentativa de tentar elucidar a possível existência de diferenças estruturais entre as amostras AQ e MO, foram realizadas análises de DSC, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.5. Os valores da temperatura de pico indicam que o grau de desnaturação das amostras EX é maior que o das demais amostras. Observa-se, também, que existe diferença significativa entre os resultados obtidos no presente trabalho e os encontrados por Klüver e Meyer (2013) para colágenos com mesma procedência e mesmas formas de desnaturação, tal diferença de valores pode ser explicada pela forma de preparo das amostras para a análise, já que no presente trabalho os resultados foram obtidos com a amostra pura e na literatura a análise foi realizada com a amostra em solução. Os diferentes modos de preparo podem levar a diferentes conformações moleculares, o que consequentemente fornece diferentes temperaturas de transição.

Tabela 4.5 – Resultados das análises de calorimetria diferencial de varredura para as amostras desnaturadas por água quente, micro-ondas e extrusão em taxas de aquecimento de 10 e 5°C/min

Amostra	Taxa de aquecimento (°C/min)	T _{pico} (°C) ¹	T _{pico} (°C) Literatura ²
AQ	10	66,0 ± 0,47 ^a	XX ³
MO	10	63,6 ± 0,90 ^b	XX ³
EX	10	57,9 ± 0,60 ^c	XX ³
AQ	5	64,5 ± 0,65 ^a	31,3-33,4
MO	5	62,9 ± 0,56 ^b	33,4
EX	5	57,9 ± 0,38 ^c	31,6

NOTAS: ¹As análises estatísticas foram realizadas entre os resultados obtidos para a mesma taxa de aquecimento. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

²Informação encontrada para os mesmos processos de desnaturação em Klüver e Meyer (2013).

³Não foram encontrados dados para estas amostras nesta taxa de aquecimento.

5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Foram analisadas no presente trabalho diferentes técnicas de preparação de amostras de colágeno para análises reológicas em concentrações de 60, 70 e 80% de água para colágenos desnaturados por uso de água quente, micro-ondas e extrusão. Verificou-se que após a mistura do pó de colágeno com água, uma etapa essencial para a plastificação e mistura completa das amostras é o aquecimento das mesmas em temperatura entre 80 e 90°C. O tempo de aquecimento não deve ser superior a 15 minutos, evitando-se assim a evaporação da água e ressecamento das amostras. Para as amostras preparadas com 60% de água a moldagem prévia das amostras para a análise reométrica mostrou-se o procedimento mais adequado, enquanto que as amostras com 70 e 80% de água puderam ser analisadas diretamente após a etapa de mistura.

As metodologias de preparação de amostras desenvolvida permitiram gerar dados com qualidade suficiente para uma primeira etapa de comparação entre os colágenos estudados, porém os resultados obtidos também mostraram que melhorias precisam ser feitas nas referidas metodologias, tendo sido identificados como pontos mais críticos neste sentido os problemas relacionados ao tempo requerido para a amostra aquecida atingir a temperatura de teste e a perda de água que acontece durante tal período.

Os resultados obtidos nas análises reológicas em regime oscilatório indicam que existem diferenças estruturais entre os colágenos desnaturados por água quente, micro-ondas e extrusão, sendo que o colágeno desnaturado por extrusão é o que apresenta maior diferença comparada com aos demais. No entanto, nas condições de preparação e nas concentrações utilizadas, todas as soluções de colágeno estudadas apresentaram um comportamento bem definido de rede elastomérica.

Em função das limitações identificadas nas metodologias de preparação de amostras desenvolvidas, este trabalho deve ser visto como o primeiro passo para a caracterização reológicas dos colágenos citados. Neste sentido, as sugestões mais relevantes para a continuação do trabalho dizem respeito justamente aos aspectos a estudar visando a melhoria das referidas metodologias: (i) análise mais detalhada dos efeitos do tempo preparação (tempo entre a retirada da amostra do forno e a análise em reômetro propriamente dita); (ii) efetuar a calibração do reômetro Gemini, para permitir estender a

análise para concentrações mais elevadas de água, nas quais a influência do tempo de preparação da amostra é menor .

Com relação especificamente às análises reológicas, outras análises seriam interessantes, como: (i) a caracterização de soluções com concentrações intermediárias àquelas testadas, para tentar modelar o comportamento das amostras frente a variações na sua concentração; (ii) varreduras de deformação a altas deformações, para verificar a resposta dos diferentes colágenos frente a quebra de suas estruturas; e (iii) avaliar a resposta do material a diferentes temperaturas.

6 REFERÊNCIAS

- BRETAS, ROSARIO E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: [s.n.].
- BROWN, E. M. Development and utilization of a bovine type I collagen microfibril model. **International journal of biological macromolecules**, v. 53, p. 20–5, fev. 2013.
- BROWNE, S.; ZEUGOLIS, D. I.; PANDIT, A. Collagen: finding a solution for the source. **Tissue engineering. Part A**, v. 19, n. 13-14, p. 1491–1494, jul. 2013.
- DEIBER, J. A.; PEIROTTI, M. B.; OTTONE, M. L. Rheological characterization of edible films made from collagen colloidal particle suspensions. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1382–1392, 2011.
- FRIESS, W; SCHLAPP, M. Effects of processing conditions on the rheological behavior of collagen dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 51, n. 3, p. 259–265, maio 2001.
- GELSE, K; PÖLSH, E; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531–1546, 2003.
- GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 247–257, 20 jan. 2010.
- KADLER, K. E. et al. Collagens at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 12, p. 1955–1958, 5 jun. 2007.
- KLÜVER, E.; MEYER, M. Preparation, processing, and rheology of thermoplastic collagen. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 6, p. 4201–4211, 15 jun. 2013.
- KURNIAWAN, N. A.; WONG, L. H.; RAJAGOPALAN, R. Early Stiffening and Softening of Collagen: Interplay of Deformation Mechanisms in Biopolymer Networks. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 3, p. 691–698, 2012.
- LAI, G.; LI, Y.; LI, G. Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 3, p. 285–291, 2008.
- MACOSKO, C. ET. AL. **Rheology: principles, measurements and applications**. [s.l: s.n.].
- MEYER, M.; BALTZER, H.; SCHWIKAL, K. Collagen fibres by thermoplastic and wet spinning. **Materials Science and Engineering**, v. 30, n. 8, p. 1266–1271, 2010.
- MEYER, M.; MÜHLBACH, R.; HARZER, D. Solubilisation of cattle hide collagen by thermo-mechanical treatment. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 1, p. 137–142, 2005.
- MOTTE, S.; KAUFMAN, L. J. Strain stiffening in collagen I networks. **Biopolymers**, v. 99, n. 1, p. 35–46, 2012.

SALOMÉ MACHADO, A. A.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Thermal and Rheological Behavior of Collagen-Chitosan blends. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 67, n. 2, p. 491–498, 2002.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 929–958, jun. 2009.

SUN, W. et al. Large amplitude oscillatory shear studies on the strain-stiffening behavior of gelatin gels. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 33, n. 1, p. 70–83, 2015.

VADER, D. et al. Strain-Induced Alignment in Collagen Gels. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5902, 16 jun. 2009.

YANG, Y.; KAUFMAN, L. J. Rheology and confocal reflectance microscopy as probes of mechanical properties and structure during collagen and collagen/hyaluronan self-assembly. **Biophysical journal**, v. 96, n. 4, p. 1566–85, 18 fev. 2009.

YANG, Z. et al. Nonlinear Behavior of Gelatin Networks Reveals a Hierarchical Structure. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 2, p. 590–600, 2016.

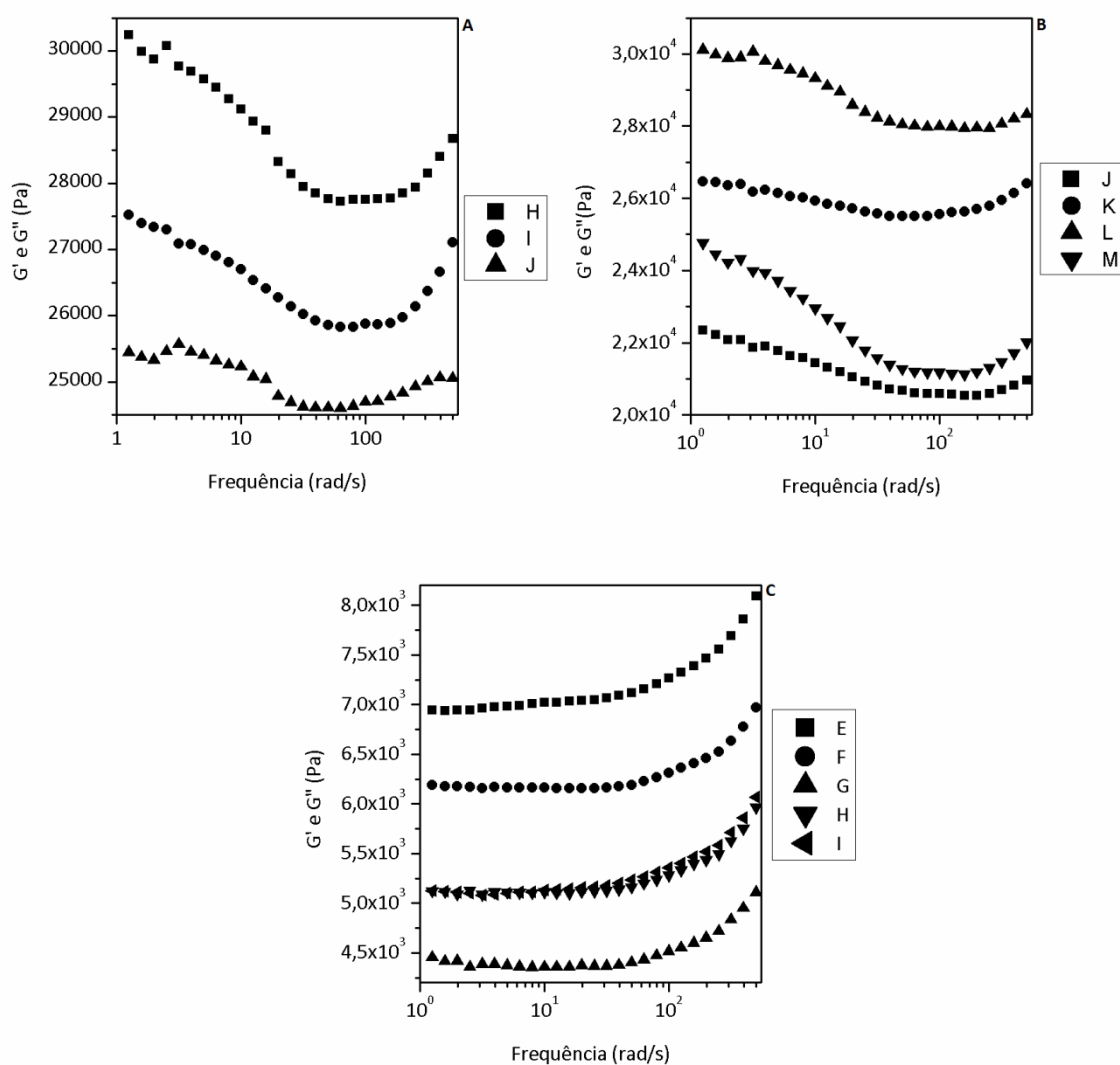
ZHANG, M. et al. Rheological properties of fish skin collagen solution: Effects of temperature and concentration. **Korea Australia Rheology Journal**, v. 22, n. 2, p. 119–127, 2010.

ZHANG, Z.; LI, G.; SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 90, n. 1, p. 23–28, 2006.

ZUBER, M. et al. Collagen based polyurethanes—A review of recent advances and perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 366–374, 2015.

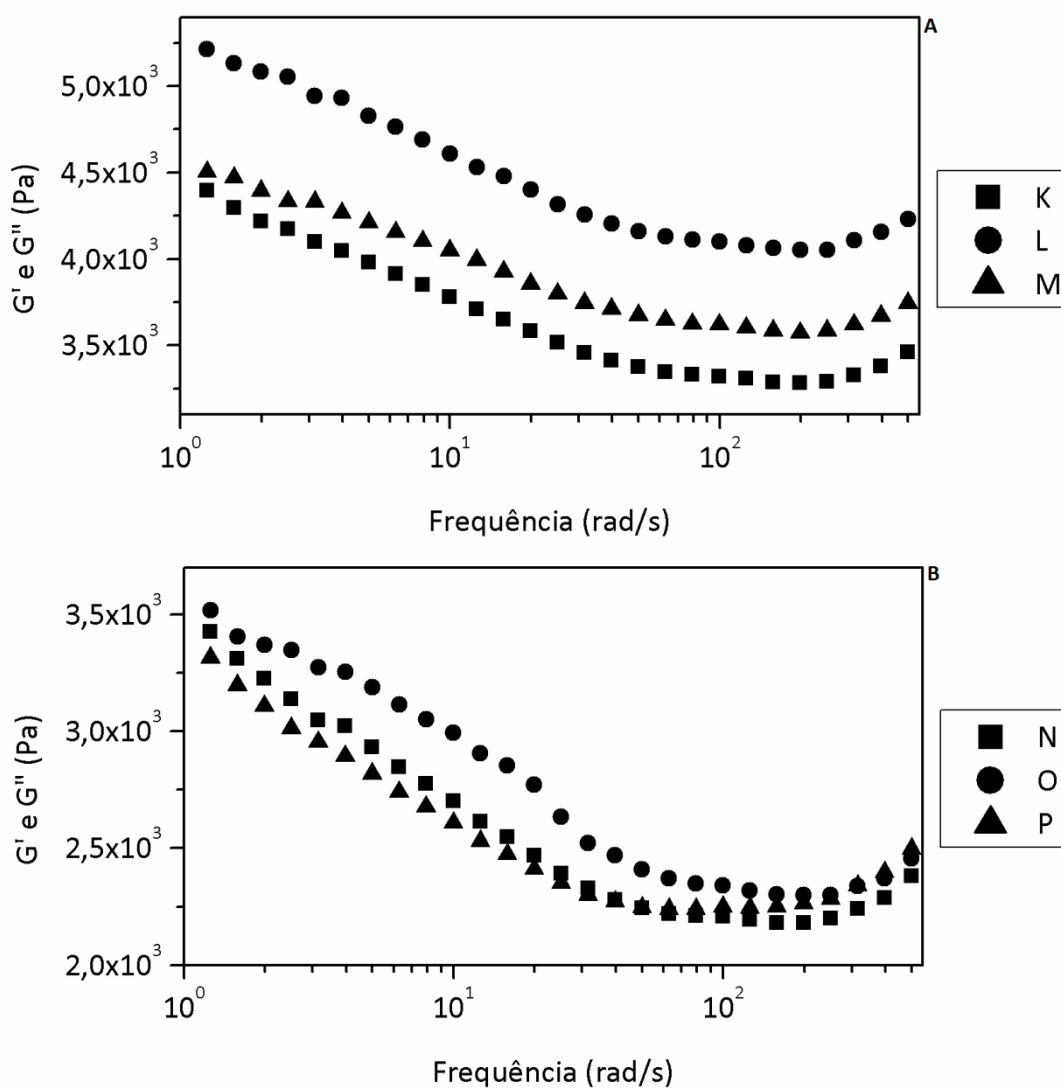
APÊNDICE A

Figura A.1 - Módulos de armazenamento em cisalhamento para colágenos desnaturados por água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C) à 25°C e com 70% de água.



Nota: Todas as repetições do colágeno AQ foram realizadas com a metodologia AF. Para a amostra MO, as repetições foram feitas utilizando as seguintes metodologias: AFAF (J), AFAQ (K) e AF (L e M). No caso das amostras EX as metodologias usadas foram: AFAF (E e F) e AF (G, H e I).

Figura A.2 - Módulos de armazenamento em cisalhamento para amostras desnaturadas por água quente (A) e micro-ondas (B) à 25°C, com concentração de 80% de água e obtidos no reômetro Ares



APÊNDICE B

Figura B.1 - Varreduras de deformação para o colágeno AQ nos testes com concentração de 60% (A), 70% (B), e 80% (C) realizadas no reômetro Ares e com concentração de 80% realizadas no reômetro Gemini (D).

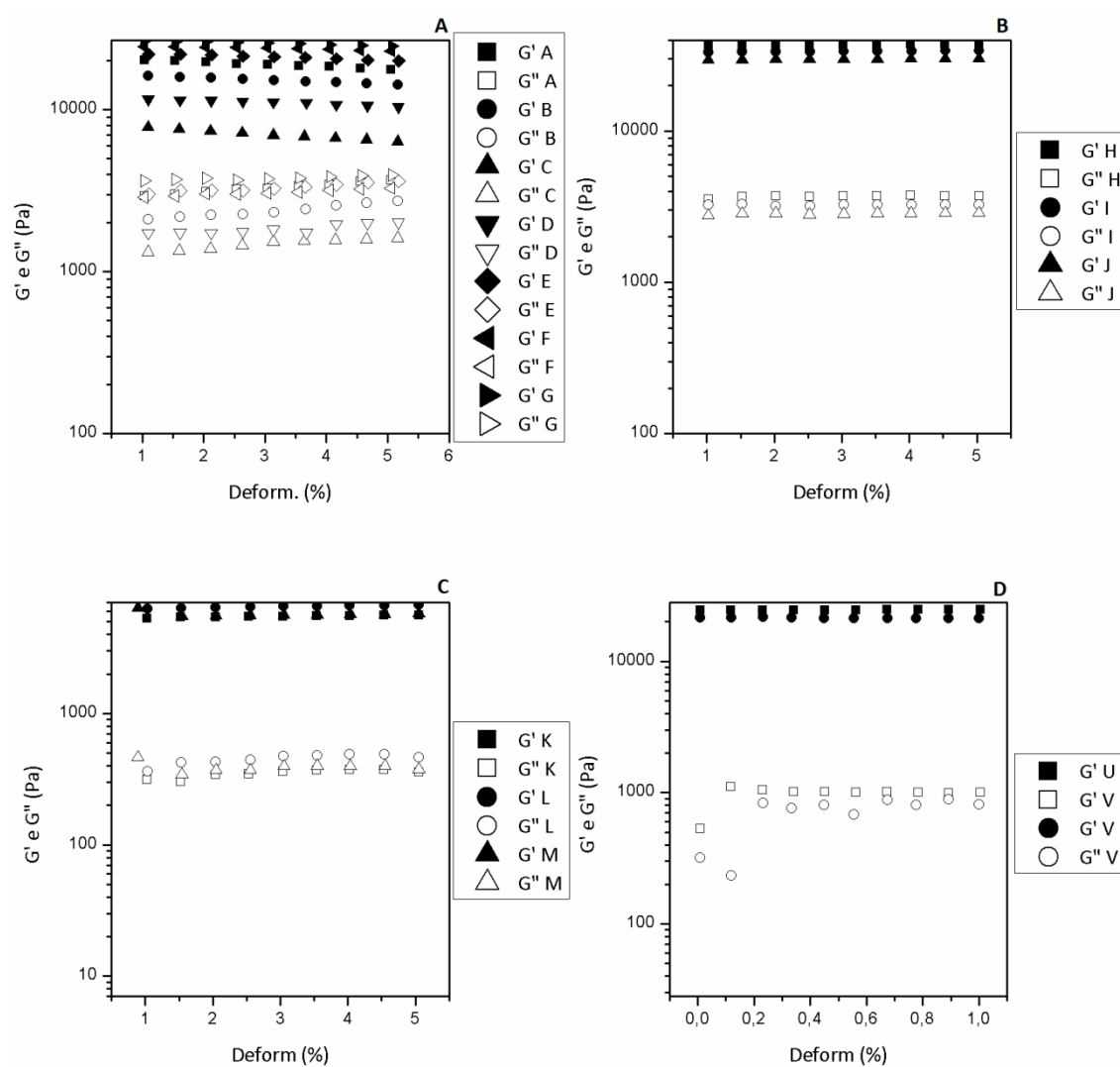


Figura B.2 - Varreduras de deformação para o colágeno MO nos testes com concentração de 60% (A), 70% (B), e 80% (C) realizadas no reômetro Ares e com concentração de 80% realizadas no reômetro Gemini (D).

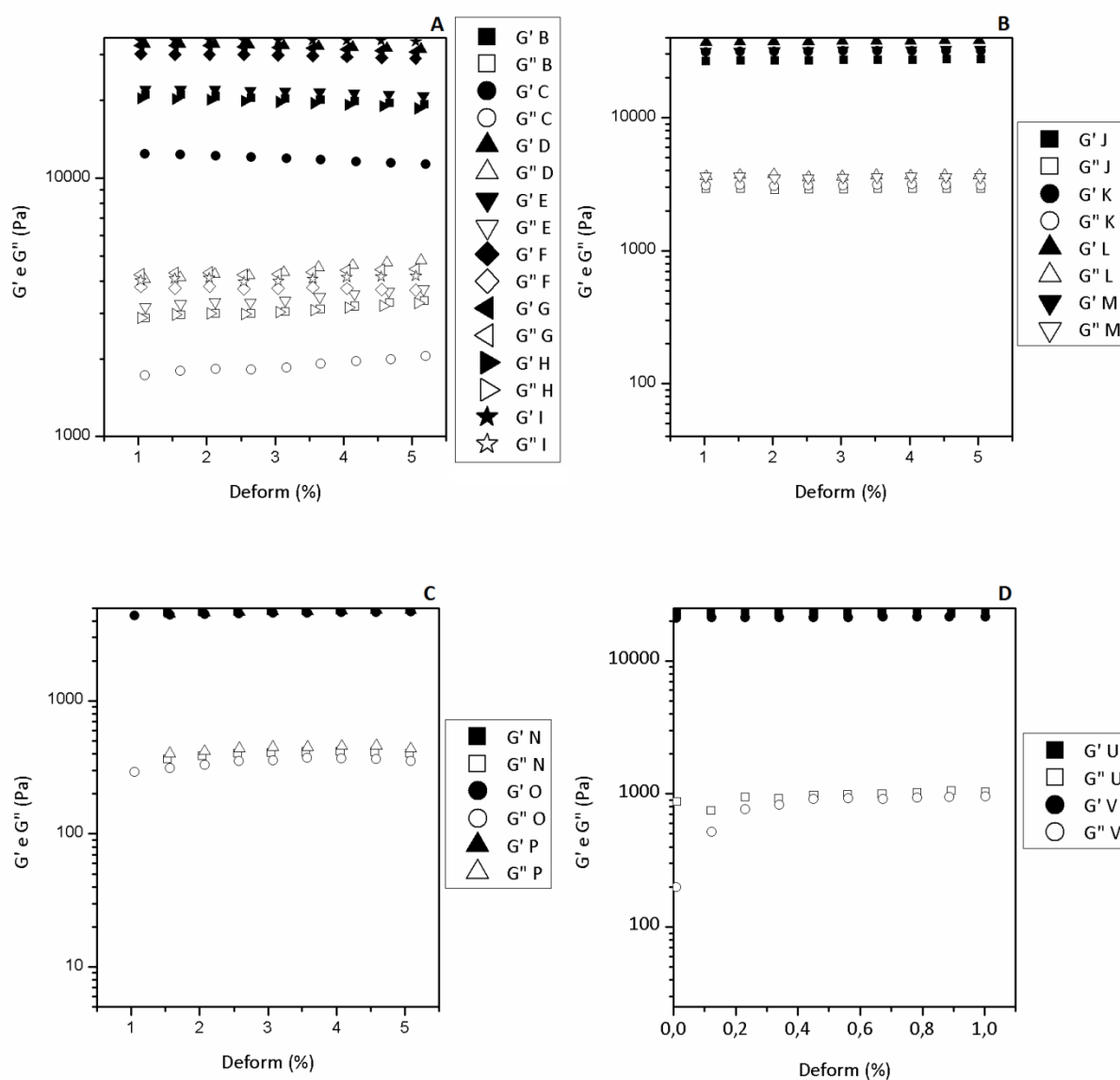
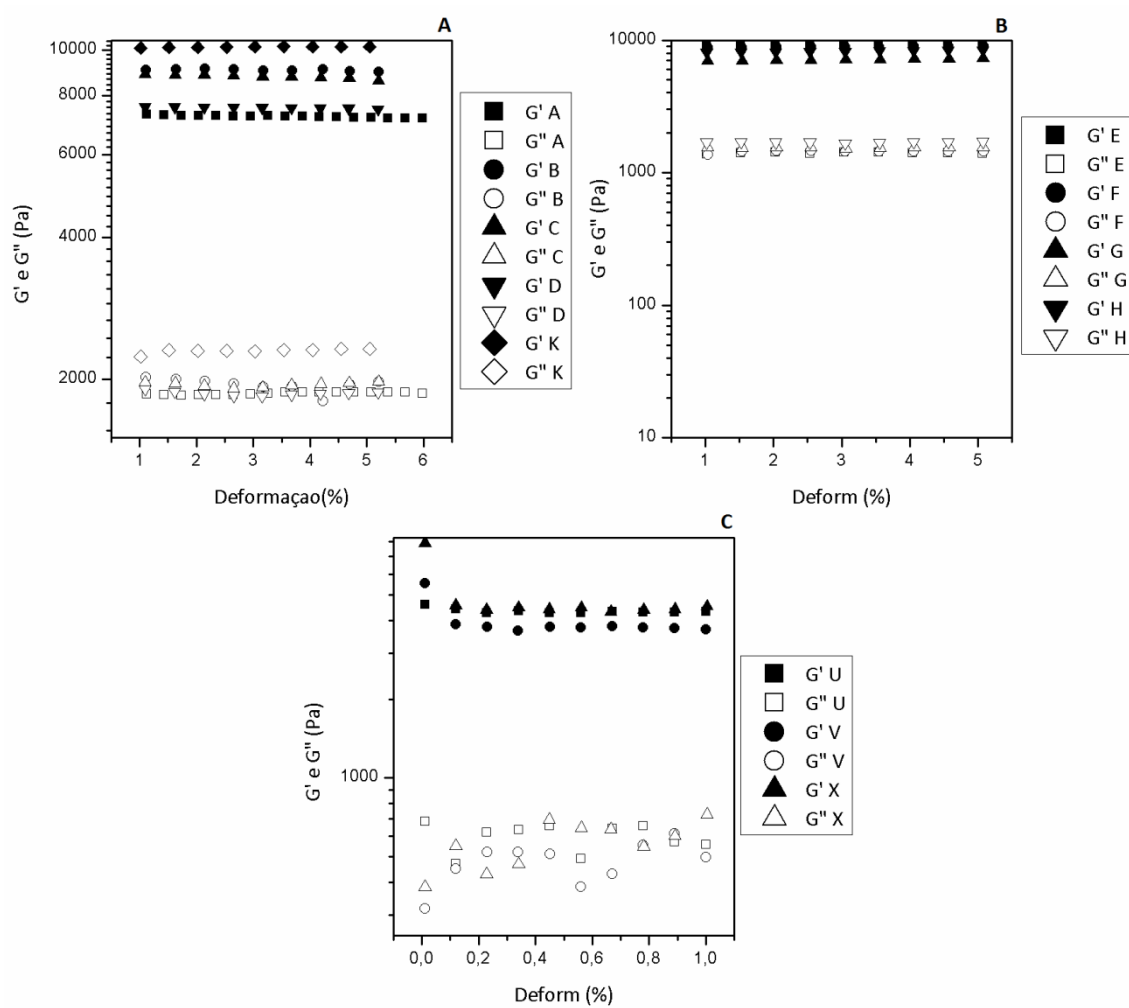


Figura B.3 - Varreduras de deformação para o colágeno EX nos testes com concentração de 60% (A) e 70% (B) realizadas no reômetro Ares e com concentração de 80% realizadas no reômetro Gemini (C).



APÊNDICE C

Figura C.1 - Módulos médios de armazenamento e de perda em cisalhamento para a primeira e segundas varreduras de frequência para amostras de colágeno com 60% de água desnaturadas por: água quente (A), micro-ondas (B) e extrusão (C).

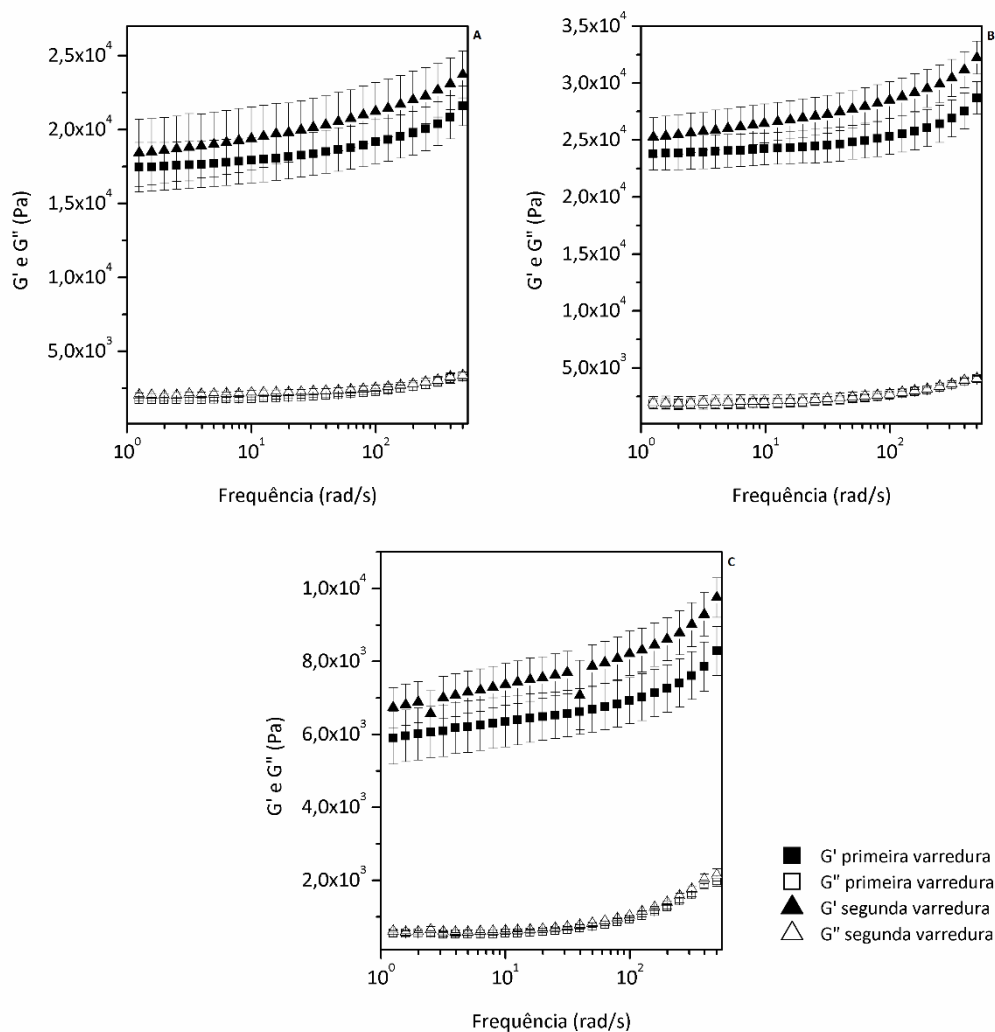


Figura C.2 - Módulos médios de armazenamento e de perda em cisalhamento para a primeira e segundas varreduras de frequência para amostras de colágeno com 70% de água desnaturadas por: água quente (A) e extrusão (B).

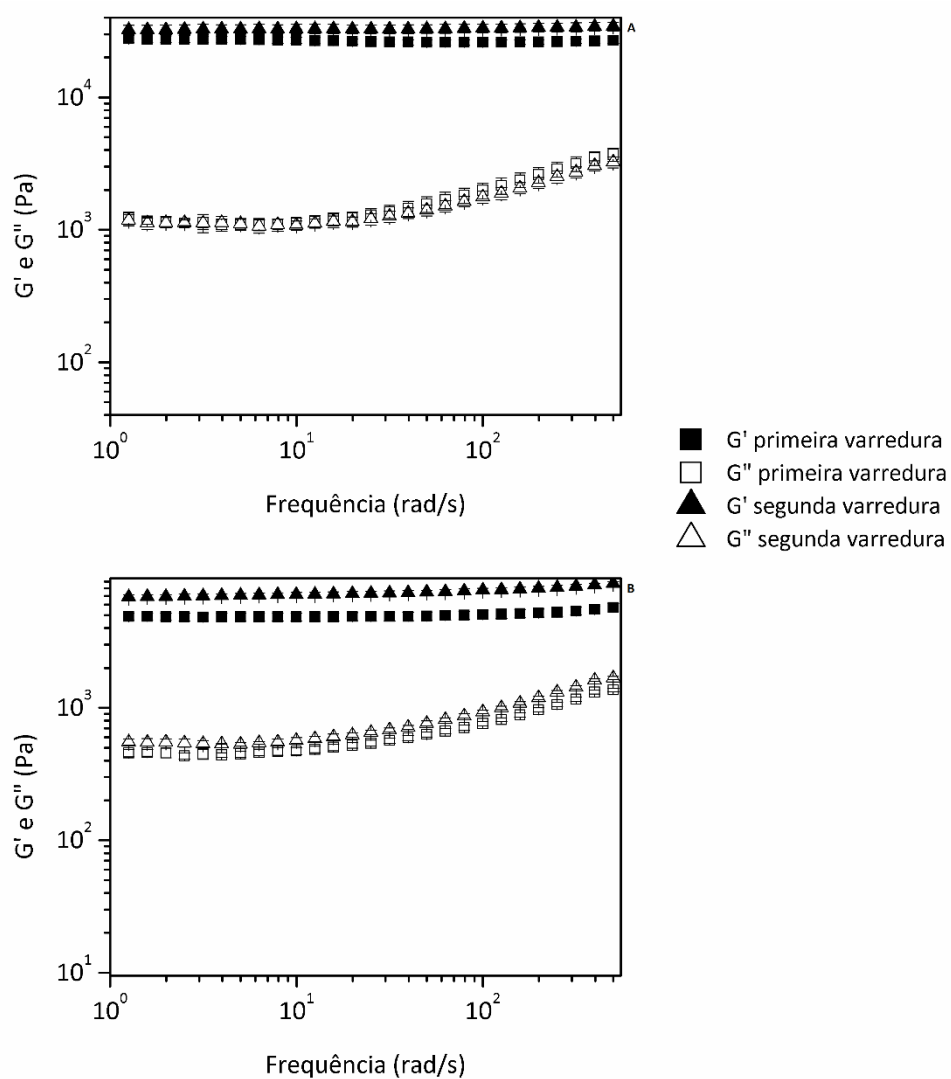
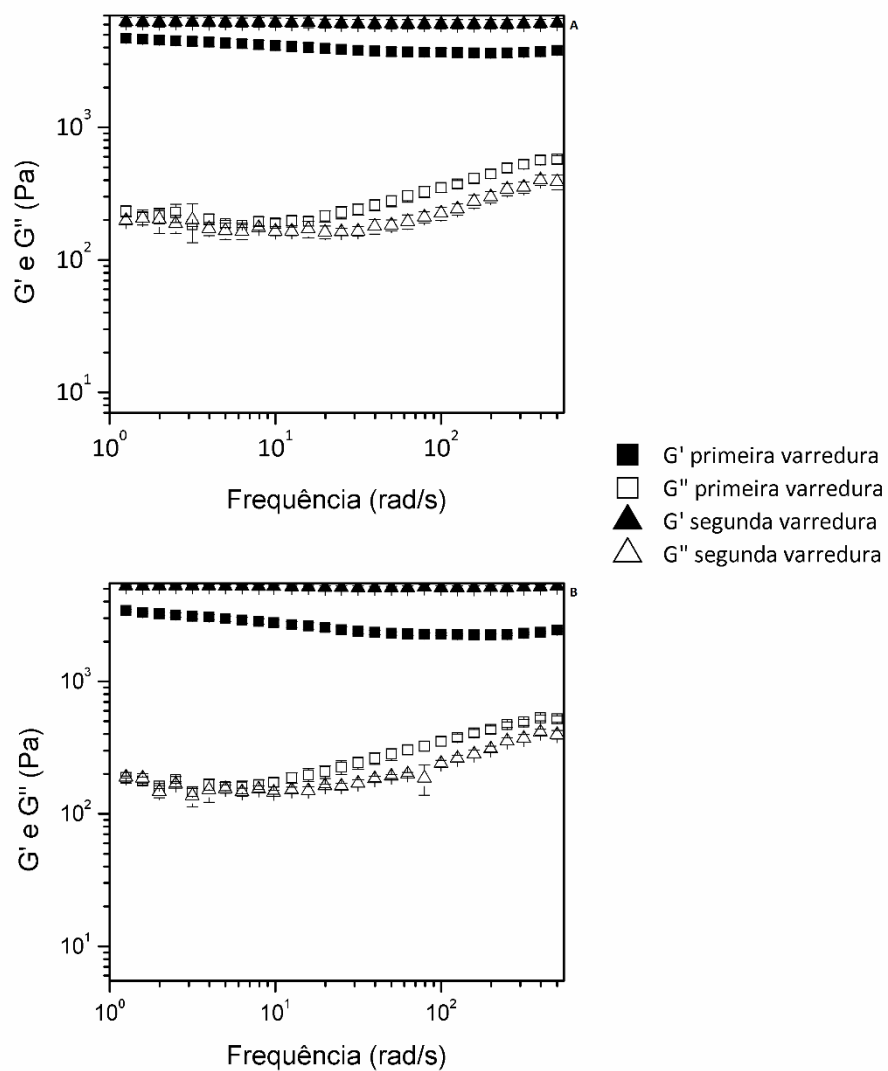
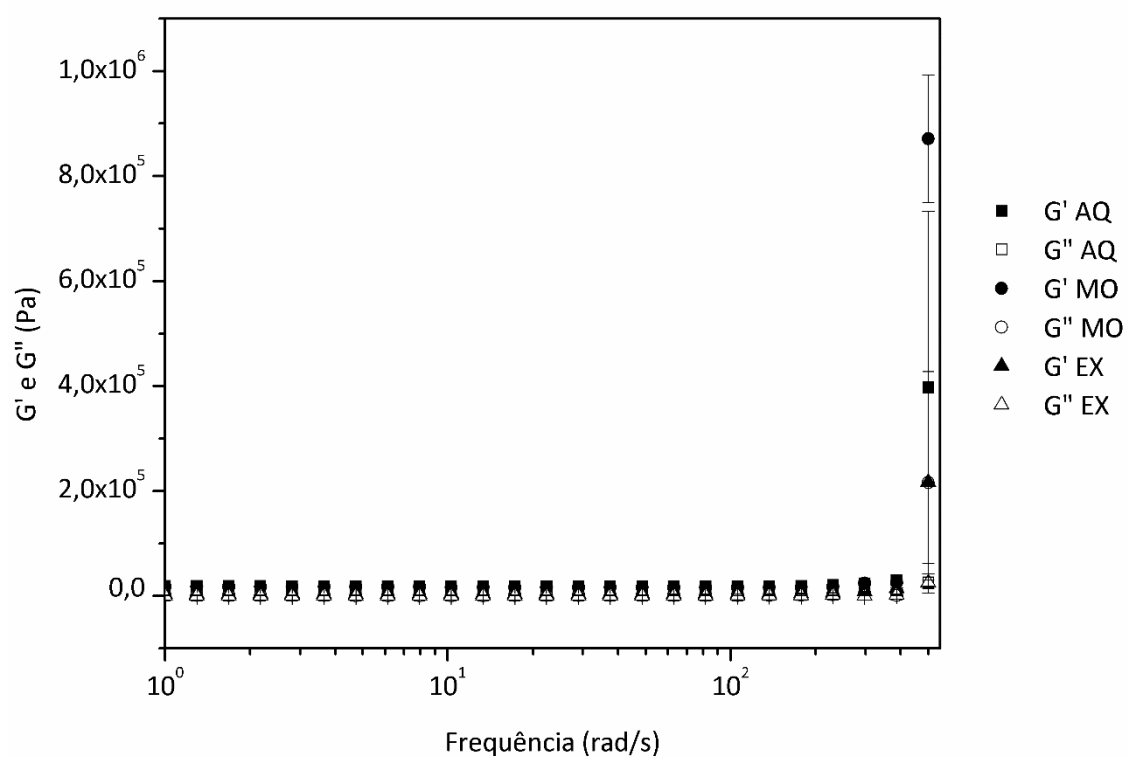


Figura C.3 - Módulos médios de armazenamento e de perda em cisalhamento para a primeira e segundas varreduras de frequência para amostras de colágeno com 80% de água desnaturadas por: água quente (A) e micro-ondas (B).



APÊNDICE D

Figura D.1 – Resultados da varredura de frequência completa realizada no reômetro Gemini para as três amostras de colágeno.



APÊNDICE E

Tabela E.1 – Resultados estatísticos realizados para amostras com teores de 60% de água, agrupadas por frequência.

Frequência (rad/s)	AQ60	MO60	EX60
500	21593,0±1347,0 ^a	28694 ± 1447,5 ^b	8284,8 ± 667,4 ^c
25,05	18251,7±1477,8 ^d	24459,8 ± 1464,4 ^e	6522,1 ± 637,1 ^f
1,25	17465,3±1670,0 ^g	23806,5 ± 1449,5 ^h	5902,3 ± 720,0 ⁱ

Nota: Sobrescritos com letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Tabela E.2 – Resultados estatísticos realizados para amostras com teores de 70% de água, agrupadas por frequência.

Frequência (rad/s)	AQ70	MO70	EX70
500	26945,5 ± 1260,4 ^a	24426 ± 2938,5 ^a	5712,9 ± 403,0 ^b
25,05	26322,7 ± 1210,2 ^c	24186,5 ± 2826,0 ^c	4882,7 ± 344,2 ^d
1,25	27736,7 ± 1670,2 ^e	25919,8 ± 2365,8 ^e	4900,5 ± 297,4 ^f

Nota: Sobrescritos com letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes e sobrescritos iguais indicam valores estatisticamente iguais

Tabela E.3 – Resultados estatísticos realizados para amostras com teores de 80% de água, agrupadas por frequência.

Frequência (rad/s)	AQ80	MO80
500	3811,5 ± 279,1 ^a	2444,8 ± 43,3 ^b
25,05	3876,5 ± 292,2 ^c	2458,8 ± 117 ^d
1,25	4704,5 ± 340,2 ^e	3418,5 ± 68,9 ^f

Nota: Sobrescritos com letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Tabela E.4 – Resultados estatísticos realizados para o colágeno AQ entre diferentes concentrações, agrupados por frequência.

Frequência	AQ60	AQ70	AQ80
500	21593,0±1347,0 ^a	26945,5 ± 1260,4 ^b	3811,5 ± 279,1 ^c
25,05	18251,7±1477,8 ^d	26322,7 ± 1210,2 ^e	3876,5 ± 292,2 ^f
1,25	17465,3±1670,0 ^g	27736,7 ± 1670,2 ^h	4704,5 ± 340,2 ⁱ

Nota: Sobrescritos com letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes

Tabela E.5– Resultados estatísticos realizados para o colágeno MO entre diferentes concentrações, agrupados por frequência.

Frequência	MO60	MO70	MO80
500	28694 ± 1447,5 ^a	24426 ± 2938,5 ^a	2444,8 ± 43,3 ^b
25,05	24459,8 ± 1464,4 ^c	24186,5 ± 2826,0 ^c	2458,8 ± 117 ^d
1,25	23806,5 ± 1449,5 ^e	25919,8 ± 2365,8 ^e	3418,5 ± 68,9 ^f

Nota: Sobrescritos com letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes e sobrescritos iguais indicam valores estatisticamente iguais

Tabela E.6– Resultados estatísticos realizados para o colágeno EX entre diferentes concentrações, agrupados por frequência

Frequência	EX60	EX70
500	8284,8 ± 667,4 ^a	5712,9 ± 403,0 ^b
25,05	6522,1 ± 637,1 ^c	4882,7 ± 344,2 ^d
1,25	5902,3 ± 720,0 ^e	4900,5 ± 297,4 ^f

Nota: Sobrescritos com letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.